Biodegradacao do fungicida ...
1996 TS-PP-1996.00353
CNPMA-3164-1

BIODEGRAÇÃO DO FUNGICIDA CARBENDAZIM

Célia Maria Maganhotto de Souza Silva

996.00353

BIODEGRADAÇÃO DO FUNGICIDA CARBENDAZIM

CÉLIA MARIA MAGANHOTTO DE SOUZA SILVA

Orientador: Dr. Itamar Soares de Melo

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Área de Microbiologia Aplicada).

Rio Claro
Estado de São Paulo - Brasil
Agosto de 1996

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, e em particular:

Ao Dr. Itamar Soares de Melo pela orientação, amizade e apoio;

A Dra. Rosângela Blotta Abakerli pela orientação, colaboração, paciência e confiança constante;

Aos colegas dos laboratórios de Análise de Resíduos e Microbiologia pela convivência e colaboração;

A estagiária Cíntia Aparecida Linhares pelo inestimável apoio e colaboração;

A colega Maria Inês Martins pela colaboração na digitação e normatização deste trabalho.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO 01
2. OBJETIVOS 04
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 05
3.1. Fungicidas 05
3.1.1. Benzimidazóis 06
3.1.2. Benzimidazóis como agentes mutagênicos 08
3.1.3. Adsorção e mobilidade dos benzimidazóis em solos 11
3.2. Efeito dos benzimidazóis nos microrganismos e suas atividades no solo 12
3.2.1. População microbiana 13
3.2.1.1. Bactérias 14
3.2.1.2. Fungos 15
3.2.1.3. Actinomicetos 16
3.3. Persistência e degradação dos benzimidazóis nos solos 17
3.4. Degradação química x microbiana dos benzimidazóis 21
4. MATERIAL E MÉTODOS..... 26
4.1. Reagentes 26
4.2. Equipamentos 27
4.3. Microrganismos utilizados 27
4.4. Soluções e meios de cultura utilizados 27
4.4.1. Solução padrão de carbendazim 27
4.4.2. Solução de carbendazim para testes de biodegradabilidade 28
4.4.3. Fase móvel 28
4.4.4. Meio mínimo (MM) (PONTECORVO *et al.*, 1953) 28
4.4.5. Meio completo (MC) PONTECORVO *et al* (1953) (modificado por AZEVEDO & COSTA, 1973) 28
4.4.6. Meio batata-dextrose-ágar (BDA) 28
4.4.7. Meio batata-dextrose 50% (BD-50%) 29
4.4.8. Aveia-ágar 29

4.4.9. Sabouraud 29
4.4.10. Suco V-8 29
4.4.11. Ágar-malte 29
4.4.12. Czpeck 29
4.4.13. Meio sintético básico (MSB) 29
*Elementos Traços (por litro) 30
Fontes de Carbono e Nitrogênio adicionadas ao MSB 30
4.4.14. Solução salina (0,85%) 30
4.4.15. Solução de "Tween-80" (0,1% V/V) 30
4.5. Isolamento de microrganismos degradadores de benomil 30
4.6. Recuperação dos resíduos de carbendazim 31
4.7. Avaliação da biodegradabilidade de carbendazim 33
4.8. Cromatografia de camada delgada (ccd) 34
4.9. Estimativa da biomassa de ***A. alternata*** 35
4.10. Requisitos nutricionais 35
4.10.1. Seleção de meios de cultura para crescimento e esporulação 35
4.10.2. Influência de fontes de carbono, nitrogênio e vitaminas sobre o crescimento de ***A. alternata*** 36
4.10.3. Caracterização citológica 37
4.11. Análise eletroforética para os padrões de proteínas totais e esterases 37
4.12. Teste de patogenicidade do isolado de ***Alternaria alternata*** 38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 40
5.1. Isolamento de microrganismos resistentes ao benomil 40
5.2. Recuperação dos resíduos de carbendazim 42
5.3. Avaliação da biodegradabilidade de carbendazim 46
5.4. Estimativa da biomassa de ***A. alternata*** 50
5.5. Cromatografia em camada delgada (ccd) 53
5.6. Requisitos nutricionais 54
5.6.1. Seleção de meios de cultura para crescimento e esporulação 54
5.6.2. Influência das fontes de carbono, nitrogênio e vitaminas 56

5.7. Caracterização citológica 59
5.8. Caracterização bioquímica 62
5.9. Testes de patogenicidade do isolado de ***Alternaria alternata*** 65
6. CONCLUSÕES 67
7. RESUMO 68
8. SUMMARY 69
9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA 70
Apêndice 83

1. INTRODUÇÃO

Os pesticidas têm um papel significante no aumento da produção de alimentos, e em vista do aumento da demanda por alimento, espera-se que o uso desses químicos aumente. Contudo, alguns deles foram classificados como químicos tóxicos persistentes e isto tem resultado em preocupações bastante sérias sobre a contaminação ambiental.

Os solos férteis e produtivos são a fonte primária das primeiras civilizações e um elo essencial no ciclo de vida. As plantas terrestres usam a energia da luz solar, os nutrientes básicos do solo e a atmosfera para sintetizar os compostos alimentares usados pelas formas superiores de vida. Os microrganismos controlam a produtividade do solo pela reciclagem do carbono, nitrogênio e outros minerais contidos nos resíduos vegetais e animais, para formas que estarão novamente disponíveis para o uso pelas plantas. A comunidade microbiana do solo também regula a produção e a destruição dos poluentes ambientais como óxido nitroso, metano, nitrito e outros compostos biológicamente tóxicos. A abundância numérica, altas taxas reprodutivas, diversidade de tipos e atividades metabólicas, e uma ampla capacidade de sobreviver em uma variedade de condições ambientais, são características únicas da população microbiana do solo. A comunidade microbiana do solo, portanto, possui um amplo poder catalítico e potencial metabólico, o que ajuda a manter a qualidade do recurso solo.

A necessidade de reduzir o impacto de pesticidas no ambiente tem despertado o interesse científico para a biodegradação de pesticidas e compostos relacionados. Os aspectos da biodegradação de pesticidas variam desde a elucidação dos passos na rota de degradação até os complexos modelos de simulação matemática que predizem o movimento e destino dos pesticidas. Alguns trabalhos, focalizam os aspectos bioquímicos e genéticos da degradação de pesticidas por microrganismos isolados do solo (MUNNECKE *et al.*, 1982; MACRAE, 1989), outros, examinam a taxa de degradação nos sistemas solos e água com atenção específica para o componente microbiológico (MOORMAN, 1994).

A degradação de pesticidas no solo é afetada por reações abióticas, microrganismos e ou suas enzimas. A completa degradação de um pesticida é alcançada apenas por um pequeno número de linhagens microbianas que são capazes de crescer utilizando o mesmo pesticida como única fonte de carbono (ALEXANDER, 1981). A degradação normalmente é acompanhada pelo ganho de energia e pelo crescimento. São formados produtos intermediários, os metabólitos, os quais podem vir a ser mineralizados para dióxido de carbono e outras pequenas moléculas inorgânicas. Algumas moléculas orgânicas podem ser formadas também e podem ser usadas para a biossíntese e junção do reservatório do carbono natural.

As pesquisas sob transformações bióticas e degradação de pesticidas pode ocorrer sob condições de laboratório e, neste caso levam vantagem sobre os estudos de campo uma vez que, o uso de condições controladas permite verificar o papel de cada fator que contribui para a degradação. O papel dos microrganismos na degradação dos pesticidas vem sendo estudada pela comparação do metabolismo em amostras de solo esterilizado e em solos naturais. O isolamento de microrganismos efetivos na degradação e sua atuação comprovada por bioensaio (cultivo de microrganismo em meio acrescido de pesticida) é mais um passo na avaliação do comportamento do produto químico num sistema. A avaliação qualitativa e quantitativa do metabolismo do pesticida é possível através de diversas técnicas como o emprego da tecnologia nuclear, com a utilização pesticidas radiomarcados, cromatografia a gás, cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência.

O envolvimento microbiano na degradação de um pesticida é geralmente estabelecido por: 1) degradação mais rápida em amostras de solos não estéreis, quando comparado a solos estéreis; 2) uma "fase lag" inicial seguida de uma rápida perda do produto atribuída a adaptação do microrganismo; 3) "fase lag" inicial curta ou inexistente quando há aplicações sucessivas do composto orgânico devido ao enriquecimento de microrganismos degradadores do pesticida; 4) desprendimento de $^{14}CO_2$ de ^{14}C-pesticidas aplicados nos sistemas biológicos; e 5) demonstração final e conclusiva da degradação de pesticidas em culturas com microrganismos degradadores isolados.

2. OBJETIVOS

Com a finalidade de avaliar os processos envolvidos nas interações entre o fungicida carbendazim e a microbiota do solo, realizou-se o presente trabalho cujos objetivos específicos foram:

Determinar os microrganismos capazes de crescerem em meio suplementado com benomil como única fonte de carbono e energia.

Selecionar e caracterizar microrganismos capazes de degradar carbendazim.

Quantificar a biodegradação de carbendazim através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. FUNGICIDAS

Os fungos parasitas têm uma íntima relação com a planta hospedeira e sua erradicação pode prejudicar as associações benéficas. Os fungicidas podem ser divididos em: a) protetores, os quais são usados para formar uma película superficial no vegetal para prevenir a germinação ou estabelecimento de esporos fúngicos; b) erradicantes, que eliminam uma infecção fúngica já estabelecida e, c) curativos, que atenuam os sintomas ou reparam os danos provocados pelos patógenos (KIMATI, 1995).

Antes do desenvolvimento de fungicidas orgânicos sintéticos a proteção de plantas contra as doenças fúngicas dependia do uso de compostos de enxofre e cobre. O enxofre elementar era aplicado como partículas dispersas ou como solução coloidal. O enxofre calcário mais solúvel em água era entretanto mais fácil de formular e aplicar, e sua decomposição subsequente, na superfície foliar, resultava em enxofre livre.

A calda bordalesa introduzida em 1885, para controlar míldio em uva, é basicamente um hidróxido cúprico precipitado na mistura de sulfato de cobre e hidróxido de cálcio. O óxido cúprico e oxicloreto de cobre tem também sido amplamente utilizados como protetores. A principal ação fungitóxica dos compostos de cobre é provavelmente um efeito não específico do cobre em grupos sulfidrílicos das enzimas.

Os compostos mercuriais foram amplamente utilizados como fungicidas. Os compostos mercuriais orgânicos foram introduzidos em 1915, principalmente em tratamento de sementes de cereais. Estes compostos são altamente efetivos, porém a toxicidade de seus componentes, unida as suas indesejadas propriedades de acúmulo no ambiente, levaram a um declínio de seu uso.

Os fungicidas que contém enxofre orgânico como thiram, captam, maneb e zineb, são amplamente utilizados como protetores, porém sua persistência nas folhagens ou no ambiente é limitada.

Recentemente, têm sido desenvolvidos fungicidas orgânicos efetivos, com atividade sistêmica dentro da planta. Este grupo inclue o benomil, etirimol e tiofanato metílico, e apresentam baixa toxicidade para os mamíferos, e alta eficiência no controle de doenças fúngicas.

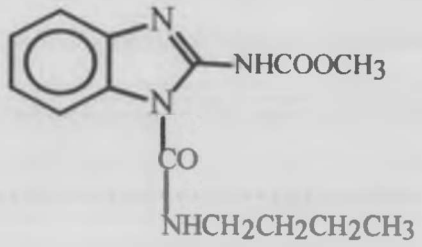
3.1.1. **Benzimidazóis**

Dentre os fungicidas orgânicos com ação sistêmica dentro da planta, os benzimidazóis são os mais conhecidos devido à sua propriedade e eficácia no controle de importantes doenças. No entanto, apresentam problemas decorrentes da manifestação de resistência em fungos fitopatogênicos. O primeiro composto desenvolvido foi o tiabendazol, o qual foi introduzido em 1961, como um vermífugo utilizado em medicina humana e veterinária. A seguir foram introduzidos o benomil, carbendazim e fuberidazol. O ferbendazol, mebendazol, oxibendazol e parabendazol possuem propriedades anti-helmínticas e são utilizados na medicina veterinária, ao passo que o nocodazol foi descrito como sendo ativo contra tumores em mamíferos, incluindo o homem (DAVIDSE, 1982).

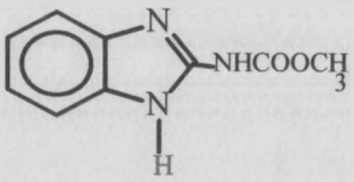
O benomil, [metil- [1 - (butilcarbamoil) - 1H - benzimidazol - 2 - il-carbamato], introduzido em 1967 como fungicida sistêmico, é o mais extensivamente utilizado na agricultura para controlar um amplo espectro de fungos patogênicos, além de apresentar propriedades acaricidas (RAJAGOPAL *et al.*, 1984a). O destino desse produto no ambiente não está totalmente esclarecido. Uma das razões para explicar este fato é a sua baixa solubilidade, o que dificulta o acompanhamento do comportamento do benomil na

água. Outra razão é que, uma vez dissolvido na água, o benomil degrada rapidamente para carbendazim (metil - benzimidazol - 2 - il-carbamato) (CLEMONS & SISLER, 1969), o qual é um fungicida sistêmico.

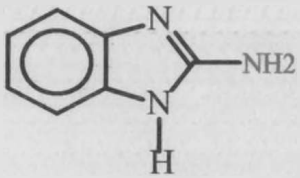
O carbendazim (MBC), produto da hidrólise do benomil, é um composto estável, insolúvel em água e um fungicida menos sistêmico que o benomil, devido a sua dificuldade em penetrar na cutícula da planta (RAJAGOPAL *et. al.*, 1984b). Outros metabólitos posteriores a carbendazim foram registrados por SIEGEL (1975) que, estudando plantas de morango tratadas com ^{14}C- carbendazim, observou após 88 dias a presença de carbendazim (32%) junto com 2-amino-benzimidazol (10% a 18%). O 2-amino-benzimidazol (2-AB) tem também sido isolado como um produto de degradação do benomil (BAUDE *et al.*, 1974). As estruturas químicas dos compostos benomil, carbendazim e 2-AB estão apresentados na Figura 1.



Benomil



Carbendazim



2-Amino-Benzimidazol

Figura 1: Estruturas químicas dos compostos benomil, carbendazim e 2-amino-benzimidazol

Outros dois fungicidas, tiofanato e tiofanato-metílico, apesar de não serem considerados benzimidazóis, devem sua atividade antifúngica à formação de carbendazim nos tecidos vegetais (YASUDA *et al.*, 1973).

3.1.2. Benzimidazóis como agentes mutagênicos

O benomil e seus produtos de conversão compartilham de um mesmo modo de ação, isto é, interferem na mitose dos fungos, agindo principalmente no crescimento micelial (DAVIDSE, 1982). A atividade biológica destes compostos benzimidazóis é de interferir com a formação e funcionamento dos microtúbulos, que estão presentes em células eucarióticas.

Os microtúbulos são um componente essencial do citoesqueleto dos eucariotos e são utilizados para diversas funções, incluindo motilidade flagelar, segregação cromossômica e manutenção da morfologia celular (SULLIVAN, 1988; BRAY, 1992). A tubulina, a subunidade estrutural protéica dos microtúbulos, é um heterodímero de duas proteínas relacionadas: α e β. Foi descoberto recentemente um novo membro da família , a γ tubulina, mas esta proteína parece não ser um componente do microtúbulo (OAKLEY, 1992; OAKLEY *et al.*, 1990; OAKLEY & OAKLEY, 1989 e ZHENG *et al.*, 1991). Os múltiplos genes da α e β tubulinas estão sujeitos a uma regulação diferencial durante o desenvolvimento e diferenciação em numerosas espécies, os quais permitem aos organismos estabelecer múltiplos e complexos programas para a expressão da tubulina em diferentes células e tecidos (SULLIVAN, 1988).

Os eucariotos apresentam sensibilidade diferenciada para cada composto benzimidazol (DAVIDSE & FLACH, 1977). A afinidade do benzimidazol à tubulina é o principal fator que determina a atividade do fungicida nos organismos. Assim, quanto maior a afinidade de ligação do benzimidazol com a tubulina, mais sensível é o organismo ao fungicida. Assim uma mutação que reduza a afinidade de ligação da tubulina com o benzimidazol sem afetar o funcionamento normal da tubulina, dá origem a uma linhagem resistente. A resistência ao benomil tem sido descrita com alteração na proteína β-tubulina, que diminui a ligação do fungicida à proteína (OSMANI & OAKLEY, 1991).

A primeira evidência de que o benomil (ou carbendazim) age sobre o fuso mitótico, foi apresentada em experimentos com *Aspergillus nidulans* (HASTIE & GEORGOPOULOS, 1971; KAPPAS *et al.*, 1974). As linhagens diplóides desta espécie, demonstraram um aumento na instabilidade nuclear, e uma maior proporção de segregantes

haplóides, na série tratada com o fungicida, em relação a série controle (HASTIE, 1970). Nestes organismos foi obtida a evidência de um mecanismo de mutação por não-disjunção cromossômica (KAPPAS *et al.*, 1974). Segundo os autores, o próprio benzimidazol não foi considerado um agente mutagênico neste ensaio e a análise genética dos segregantes, após o tratamento com o fungicida, demonstrou que a quebra cromossômica e, possivelmente também o "crossing-over" mitótico, não poderia ser a causa do aumento da freqüência de diploides segregantes. Além disso, os haploides segregantes poderiam somente ser formados através da não-disjunção mitótica. SEIBERT *et al.* (1970), testando benomil em um sistema de conversão gene-mitose com *Saccharomyces cerevisae*, não observaram atividade mutagênica do composto.

HASTIE & GEORGOPOULOS (1971) obtiveram mutantes de *Aspergillus nidulans* induzidos por radiação ultravioleta, os quais foram resistentes a benomil em várias concentrações. Os autores sugeriram que, a indução de mutação de ponto pelo benomil poderia produzir mutantes resistentes que seriam então favorecidos pela pressão seletiva, contra os fungos sensíveis.

BOLLEN & SCHOLTEN (1971) após constatarem a ineficácia de benomil contra *Botrytis cinerea* em ciclame, isolaram uma linhagem deste patógeno capaz de crescer em meio de cultura suplementado com altas doses do fungicida. GRIFFE (1973) isolou três linhagens resistentes e três linhagens sensíveis de *Colletotrichum musae*, de 1700 amostras de cascas de bananas tratadas com benomil.

STAUTON & KAVANAGH (1975) observaram em cultivos de tomate e morango tratados com benomil que, 92 e 46% destes cultivos, respectivamente, abrigavam linhagens de *B. cinerea* resistentes ao fungicida. Por outro lado, JONES & WALKER (1976) observaram o desenvolvimento de linhagens resistentes do fungo *Venturia inaequalis*, em maçã, nos três anos de uso regular de benomil.

GOLDMAN *et al.* (1993) caracterizaram uma linhagem de *Trichoderma viride* que apresenta resistência a droga antimitótica carbendazim. Esta espécie tem dois genes β -tubulina (**tub 1 e tub 2**). Os autores demonstraram que uma mutação no gene **tub 2** conferiu resistência ao carbendazim. Comparações na seqüência do **tub 2** da linhagem mutante com o tipo selvagem revelaram que uma simples substituição do aminoácido

tirosina pela histidina na posição 6, foi a responsável pela resistência ao carbendazim. Esta mutação de ponto, uma transição de citosina para timina, pôde simultaneamente conferir resistência a carbendazim e nocodazole.

As mutações β -tubulina (**ben A e ben C**), também foram extensivamente analisadas em *A. nidulans.* Dos vinte alelos **ben A** que foram sequenciados e analisados quanto às alterações ao benomil (JUNG & OAKLEY, 1990; OSMANI & OAKLEY, 1991), dezoito alelos conferiram resistência ao benomil, tiabendazol (TBZ) e nocodazol, enquanto os outros dois alelos conferiram resistência ao TBZ e supersensibilidade a outros compostos. Estas mutações foram substituições simples de aminoácidos, das quais doze mutações foram substituições para o aminoácido 6, duas foram para o aminoácido 165, quatro a cinco para o aminoácido 198 e duas para o aminoácido 200.

Em *Neurospora crassa,* a mutação para resistência ao benomil, foi identificada no aminoácido 167 (ORBACH *et al.*, 1986) e mais recentemente uma substituição no aminoácido 198, conferindo resistência ao carbendazim e sensibilidade a dietofencarb (FUJIMURA *et al.*, 1992).

Como apresentado, a resistência aos químicos, em fungos, é freqüentemente controlada por genes. As barreiras para as trocas gênicas entre populações diferentes, incluindo incompatibilidade negativa e incompatibilidade sexual, são freqüentes em fungos e FARETRA & POLLASTRO (1993), estudando mutantes isolados de *Bothryotinia fuckeliana* (*B. cinerea*) cruzados com linhagens referências de "mating type" conhecidos, determinaram a base genética das diferenças na fertilidade sexual e na resistência aos fungicidas benzimidazóis e dicarboximidas. Os autores demonstraram que os isolados de *B. fuckeliana,* que apresentavam resistência aos fungicidas benzimidazóis e dicarboximidas, levam mutações no mesmo gene Mbc1 e/ou Daf1 da linhagem referência. Assim, os isolados que causam problemas na agricultura, devido à resistência a estes fungicidas, são provavelmente mutantes alélicos. Três categorias de alelos foram identificadas nesta pesquisa, com respeito a cada gene: os responsáveis pela sensibilidade normal aos fungicidas (Mbc15 e Daf15), os que causam baixa resistência (Mbc1LR e Daf1LR), e os que causam alta resistência (Mbc1HR e Daf1HR).

3.1.3. - **Adsorção e mobilidade dos benzimidazóis em solos**

Alguns pesquisadores tem demonstrado a baixa solubilidade de benomil em água e seu movimento através do solo. RHODES & LONG (1974), estudaram a lixiviação e o escoamento superficial de benomil em casas de vegetação e os resultados indicaram que o benomil e seus produtos de degradação carbendazim e 2-amino-benzimidazol foram bastante imóveis no solo, uma vez que a maior parte dos resíduos foi encontrada nas camadas superiores do solo.

AUSTIN & BRIGGS (1976), BAUDE *et al.* (1974), RHODES & LONG (1974) e SOLEL *et al.* (1979) verificaram que o benomil e seus dois metabólitos, carbendazim e 2-amino-benzimidazol, também foram imóveis no solo e raramente lixiviados ou movimentados do sítio de aplicação. O carbendazim, aplicado em solução ou suspensão, via um sistema de irrigação por gotejamento, manteve-se restrito à camada de 0-10 cm de profundidade e num raio horizontal de 10 cm, ao redor do gotejador (SOLEL *et al.*, 1979). A lixiviação de benomil e carbendazim, em colunas de solo, foi insignificante, sendo estes compostos detectados somente na superfície (AHARONSON & KAFKAFI, 1975; HINE *et al.*, 1969 e SOLEL *et al.*, 1979).

O movimento, nos solos, de benomil e em particular de carbendazim, triplicou com a adição de ácidos surfactantes, possivelmente devido a um aumento na protonação e consequentemente um aumento na solubilidade de carbendazim (PITBALDO & EDGINGTON, 1972).

AHARONSON & KAFKAFI (1975) observaram a adsorção de MBC em diferentes solos. Os resultados indicaram um aumento na adsorção de MBC em função do aumento da acidez da suspensão dos solos. As isotermas de adsorção são dependentes do pH e isto foi atribuído a ionização de MBC em valores baixos de pH havendo a adsorção dessas moléculas protonadas ao solo. Em valores de pH constante, um aumento na força iônica resultou num decréscimo da quantidade do fungicida adsorvido. DIOS CANCELA (1992), verificou a adsorção de carbendazim em turfa e montmorilonita como uma função do cátion trocável e temperatura. A capacidade de adsorção deste fungicida no solo foi

dependente da matéria orgânica, nitrogênio e do conteúdo argiloso, tanto quanto da capacidade de troca catiônica.

Comparando solos argilosos e arenosos, LIU & HSIANG (1994) demonstraram que as isotermas de adsorção do benomil apresentaram, em situação de equilíbrio, uma interrelação quase linear entre a quantidade adsorvida do fungicida e a concentração do mesmo na solução. Segundo os autores, este fato ocorreu devido ao alto conteúdo de matéria orgânica e à capacidade de troca catiônica do solo argiloso. HELWEG (1977) e MUSUMECI *et al.* (1980b), já haviam observado a forte adsorção de carbendazim em solos ricos em matéria orgânica.

Foi também demonstrado que a maior quantidade de benomil foi captado pelas plantas em solos arenosos quando comparado a solos argilosos (FUCHS *et al.*, 1970), e que ambos, o movimento do benomil no solo e sua captação pelas plantas foram afetados pela composição e porosidade deste solo (AHARONSON & KAFKAFI, 1975). Além disso, os autores estabeleceram que ambos, a velocidade e a quantidade total da captação de benomil pela planta foram maiores quando as plantas cresceram em solos com baixo conteúdo de matéria orgânica e alto pH.

3.2. EFEITO DOS BENZIMIDAZÓIS NOS MICRORGANISMOS E SUAS ATIVIDADES, NO SOLO

O solo é um sistema vivo que suporta muitas associações microbianas, tanto benéficas como patogênicas. Estas associações são muito sensíveis a distúrbios físicos, químicos ou mesmo alterações no modo de cultivo, o que afeta drasticamente o equilíbrio microbiano, o que por sua vez altera a associação.

O equilíbrio microbiano na rizosfera ou zona de influência da raiz, é devido a atividade das plantas e dos microrganismos, os quais podem ser influenciados pelos pesticidas. O aspecto mais importante da rizosfera, quando comparado ao solo livre de raiz, é o maior número e atividade de microrganismos.

Os microrganismos que compreendem a rizosfera e o rizoplano são: bactérias, fungos, actinomicetos, algas, protozoários, e outras microfaunas. Não há evidência que as espécies de plantas favoreçam populações microbianas específicas, além das relações simbióticas bem estabelecidas entre rizóbio e leguminosas entre bactérias diazotroficas e gramíneas e as associações micorrízicas.

Os fungicidas podem atingir o solo, não só pela aplicação direta, mas também através do tratamento de sementes, deriva da aplicação na parte aérea da planta ou incorporação de folhas ou frutos tratados no solo. Os efeitos dos fungicidas nos microrganismos não alvos do solo são diferentes em condições físicas, químicas e biológicas de diferentes solos além daqueles associados à natureza e concentração do produto. Quando atingem o solo, os fungicidas podem reduzir a população dos patógenos, dos antagonistas e de outros microrganismos (alguns deles responsáveis pela mineralização da matéria orgânica, degradação de pesticidas e outros produtos, estimuladores do desenvolvimento da planta, simbiontes com a planta, etc.).

Além dos efeitos sobre os antagonistas, os fungicidas podem afetar outras atividades microbianas do solo, as quais são responsáveis por exemplo, pela manutenção da fertilidade. A atividade metabólica da população microbiana depende do número de indivíduos, assim como a atividade de cada um deles. O efeito de fungicidas em uma das atividades pode não estar correlacionado com a mudança no número total de indivíduos, mascarando assim os resultados quando se estuda o efeito destes produtos através da enumeração da população microbiana do solo.

3.2.1. **População microbiana**

Na população microbiana existe um equilíbrio dinâmico, que pode ser alterado por modificações das condições ambientais como por exemplo a adição de pesticidas ou outras substâncias ativas biológicamente.

Os pesticidas, quando aplicados em quantidades recomendadas, geralmente não afetam a população microbiana nativa do solo, ou então, causam uma mudança

temporária em certos componentes da população microbiana (GROSSBARD, 1976; MATSUMARA & BENEZET, 1978; ALEXANDER, 1981).

Os microrganismos podem utilizar os pesticidas como substrato, para a obtenção de energia ou utilizando-os como nutrientes para o metabolismo.

3.2.1.1. **Bactérias**

O número de bactérias geralmente aumenta após um tratamento com fungicidas, provavelmente como resultado da eliminação dos fungos ou aumento na quantidade de alimento proveniente destes fungos mortos, além de um decréscimo na competição. Alguns trabalhos demonstraram que o benomil nas concentrações de 1 a 50 μg/g não inibiram a população bacteriana do solo, mas sim a estimularam (HOFER *et al.*, 1971; PEEPLES, 1974, VAN FAASSEN, 1974; SIEGEL, 1975, e WAINWRIGHT & PUGH, 1974). Porém, múltiplas aplicações de benomil ao solo, ao contrário, inibiram as bactérias do solo (FOSTER & MCQUEEN, 1977). VAN FAASSEN (1974), observou que, em solos arenosos não tratados previamente com benomil, o número de bactérias aumentou com a concentração aplicada do fungicida (2,5Kg i.a./ha) mas, no mesmo solo, com aplicação prévia de 2Kg i.a./ha de benomil, uma segunda aplicação do fungicida, sob condições de laboratório, diminuiu a contagem total de bactérias de 200 a 1000 vezes.

A aplicação foliar de benomil (0,6%) em plantas de trigo, aumentou a contagem bacteriana da rizosfera (43%) e diminuiu a ocorrência de *Pseudomonas fluorescens* (16%), *Agrobacterium* (50%) e fungos (67%) (MOUBASHER *et al.*, 1984). O benomil aplicado em combinação com thiram e sulfato de estreptomicina, mostraram-se inócuos para a população de *Pseudomonas fluorescens* num solo adubado organicamente, apesar de ter ocorrido um aumento significativo na população bacteriana total em solos não adubados (FERRIS & MICHEL, 1981).

O 2-amino-benzimidazol (2-AB), derivado fungitóxico de benomil, inibiu, marcadamente o crescimento de *Pseudomonas* sp. na concentração de 250μg/g e completamente em 500μg/g de solo (FUCHS & DE VRIES, 1978a).

A aplicação dos fungicidas ethazole, tiofanato-metílicol + maneb e tiofanato-etílico + thiram, nas concentrações utilizadas pelas práticas agrícolas, produziram um aumento de 2 a 5 vezes no número total de bactérias (SMILEY & CRAVEN, 1978). Das bactérias encontradas 0,4 a 2% foram bacilos esporulantes e seu número permaneceu uniforme, indiferente ao tratamento.

Para ***Bacillus*** sp. os compostos benzimidazóis agiram como inibidores nas concentrações de 500 a 1000μg/g, com a toxicidade aumentando na ordem: 2-amino-benzimidazol > carbendazim > tiabendazol > benomil (FUCHS & DE VRIES, 1978a).

3.2.1.2. **Fungos**

Apesar dos poucos registros dos efeitos inócuos do benomil sobre a população fúngica (HOFER *et al.*, 1971; PEEPLES, 1974, VAN FAASSEN, 1974) a presença do benomil reduziu de duas a três vezes a população destes organismos e de actinomicetos do solo (SIEGEL *et al.*, 1975 e FOSTER, 1975). Assim alguns autores postularam que o benomil tem ação fungistática e não fungicida (HOFER *et al.*, 1971, PONCHET & TRAMIER, 1971 e RAYNAL & FERRARI, 1973).

Muitas espécies de fungos mostraram-se insensíveis ao benomil, na concentração de 1 μg/g, porém poucos e principalmente os Ficomicetos e membros de Stilbaceae, demonstraram insensibilidade em concentrações maiores que 10 μg/g (RAYNAL & FERRARI, 1973).

OKU *et al.* (1979), observaram que os fungos tolerantes a benomil foram mais numerosos após 35 dias de tratamento do solo com benomil quando comparados aos solos não tratados. Os gêneros *Aspergillus, Penicillium* e *Trichoderma* foram predominantes em solos tratados com benomil (PEEPLES, 1974; WINSLEY & HUANG, 1970).

Alguns autores afirmam que os gêneros *Gliocadium, Penicillium* e *Trichoderma*, predominam em solos com fungicidas, sendo que espécies de *Trichoderma* são os melhores recolonizadores (AGNIHOTRI, 1974; PEEPLES, 1974; CATSKA & VRANY, 1976). Analisando a composição das espécies de *Trichoderma* encontradas em

solos tratados, MUGHOGHO (1968) observou que muitas espécies, incluindo *T. hamatum, T. harzianum, T. koningi* e *T. viride* foram descritas várias vezes.

A aplicação de benomil, diretamente no solo (1,21Kg i.a/ha) ou através de pulverização (11,2Kg i.a./ha), diminuiu os fungos nematófagos do solo (KAPUR *et al.*, 1981). *Arthrobotrys oligospora* foi o menos afetado. As populações de *Dactylaria haptotyla, Stylopaga hadra* e *Monacrosporium ellipsosporum* diminuíram inicialmente mas recuperaram-se totalmente em 2 meses, enquanto que *Harposporium anguillulae* e *Dactylaria cândida* apresentaram recuperação parcial.

Muitos trabalhos demonstraram que benomil inibe a formação das associações micorrízicas arbusculares pertencente aos gêneros *Endogne* e *Glomus*, em cultivos de cevada, trevo, milho, cebola, soja e trigo (BAILEY & SAFIR, 1978; BOATMAN *et al.*, 1978 e DE BERTOLDI, 1978). Porém, outros fungos zigomicetos parecem ser relativamente insensíveis ao benomil (BOLLEN & FUCHS, 1970, EDGINGTON *et al.*, 1971).

Segundo EDGINGTON *et al.* (1971) o benomil foi tóxico para um amplo espectro de fungos, mas não para a totalidade dos grupos taxonômicos. Entre os Deuteromicetos, os grupos sensíveis foram Phialosporeae (*Aspergillus, Colletotrichum, Fusarium, Penicillium, Verticillium*), Arthrosporeae, Sympodulosporae e Aleuriosporae, enquanto alguns gêneros de Annelosporae e Blastoporae foram sensíveis. Todos os Porosporae (*Alternaria, Bipolaris, Curvularia, Drechslera, Stemphylium*) não foram inibidos. KIRBY (1972) e WOODCOCK (1977) também encontraram que os Oomicetos não foram sensíveis a benomil. Os Ficomicetos não foram sensíveis e os Basidiomicetos demonstraram respostas de moderada sensibilidade e insensibilidade (BOLLEN & FUCHS, 1970).

3.2.1.3. **Actinomicetos**

Os fungicidas que alteram a população de actinomicetos no solo afetam também as suas funções. VAN FAASSEN (1974), relatou que após 6, 21, 50 e 80 dias de incubação, em solos tratados com benomil nas concentrações acima de 100μg/g , houve

um aumento no número de actinomicetos proporcional ao aumento da concentração. Resultados semelhantes foram descritos por HOFER *et al.* (1971). A explicação para o fato, segundo os autores, é que os microrganismos utilizam alguns compostos que estão unidos à formulação do benomil, ou que este fungicida tenha uma ação semelhante a vitamina para estes organismos.

Ao contrário dos resultados expostos acima, SIEGEL (1975) registrou que o benomil inibiu temporariamente as populações de actinomicetos.

3.3. PERSISTÊNCIA E DEGRADAÇÃO DOS BENZIMIDAZÓIS NOS SOLOS

A velocidade de dissipação do fungicida no solo depende da natureza do pesticida, e das condições bióticas e abióticas que nele prevalecem. Assim, a meia vida (o tempo em que ocorre 50% de dissipação do químico) dos pesticidas não persistentes como os organofosforados, pode ser de poucos dias, enquanto que para os mais persistentes como por exemplo os hidrocarbonetos clorados, pode ser de muitos meses ou anos. Em solos tratados com benomil, FLEECKER *et al.* (1974) e ROUCHAUD *et al.* (1974), encontraram para a meia vida do fungicida os períodos de 3-6 e 6-12 meses em turfa e solo, respectivamente. Observaram ainda que, o produto encontrado em maior concentração foi carbendazim e o menor, o metabólito 2-amino-benzimidazol.

Nos últimos vinte anos o benomil tem sido um dos fungicidas mais amplamente utilizados (JONHSON & LAVY, 1994). Nos solos, o seu resíduo biológicamente ativo é o carbendazim (AUSTIN & BRIGGS, 1976). A persistência de benomil e carbendazim (metil-2-benzimidazol carbamato), após a aplicação, tem recebido pouca atenção.

O benomil, incorporado nas concentrações 5,6; 11,2 e 22,4 Kg i.a./ha, em parcelas de algodão irrigado, em solo argiloso, foi detectado após 12 semanas. Para todas as concentrações aplicadas a quantidade restante foi suficiente para evitar a germinação de *Phymatotrichum onnivorum*. Após dezoito semanas, os resíduos foram detectados somente nas duas concentrações mais altas (HINE *et al.*, 1969). Os mesmos autores observaram em

experimentos de laboratório que, o benomil aplicado ao solo nas concentrações de 10 e 100μg/g, e incubado às temperaturas de 16°, 20°, 25°, 30°, e 40°C, foi detectado, mesmo após 19 semanas. As concentrações residuais foram suficientes para evitar a germinação de *Phymatotrichum onnivorum*, exceto para a concentração de 10μg/g incubado a 40°C. Os autores observaram também que a concentração original de 100μg/g de benomil, diminuiu para 30μg/g, após um período de 19 semanas, quando incubado a 40°C.

RAYNAL & FERRARI (1973) detectaram 8μg/g de benomil, após seis meses da aplicação de 100μg/g do fungicida, em solo arável. Um composto relacionado a benzimidazóis, o tiofanato-metílico, foi menos persistente que o benomil (NETZER & DISHON, 1973). O benomil foi detectado nos solos mesmo após três meses de sua aplicação. A concentração adicionada (100μg/g) diminuiu mais rapidamente em extrato de solos ricos em húmus do que em solos de jardim, e diminuiu lentamente em extratos de solos minerais (HELWEG, 1973). Após seis meses da aplicação do fungicida, o efeito fungistático em extrato de solo foi menor que 10% em solos com húmus, cerca de 30% em solos de jardim e 75% em solos minerais. Nestes trabalhos, não ficou claro se o efeito fungistático foi devido ao benomil e/ou carbendazim. Possivelmente, o carbendazim, facilmente formado a partir do benomil, foi responsável pela fungistase.

Em soluções aquosas ou solventes orgânicos, o benomil perde rapidamente o grupo butilcarbamoil formando então o carbendazim (MBC), o qual é um componente estável e igualmente tóxico (CHIBA & DOORNBOS, 1974; CLEMONS & SISLER, 1969; KILGORE & WHITE, 1970). HELWEG (l973), observou que todo o benomil adicionado ao solo foi convertido para carbendazim dentro de poucas horas.

Em estudos mais recentes, tem sido dado mais ênfase à persistência do carbendazim do que a do benomil. O carbendazim resistiu a degradação e permaneceu, após muitos meses, como o maior metabólito de benomil nos solos, junto com 2-amino-benzimidazol (2-AB), como o menor produto (BAUDE *et al.*, 1974). O benomil marcado com ^{14}C, aplicado em solução aquosa se decompôs rapidamente nos solos. Em solos arenosos, foram detectados resíduos deste fungicida após quatro semanas, enquanto que, após doze semanas, só foram detectados carbendazim e 2-AB. A meia vida dos resíduos

^{14}C foi de um ano. Contudo, em solos argilosos, mesmo após 24 meses, cerca de 51% do ^{14}C total foi detectado.

LAURISDEN *et al.* (1977), citado por RAJAGOPAL *et al.* (1984b) estudaram a persistência de benomil em solos, pela análise de carbendazim e 2-AB, durante dois anos. A meia vida dos resíduos totais foi de quatro meses em solos arenosos e de dez meses em solos argilosos. Em solos secos ao ar, a perda de carbendazim em nove meses, foi somente de 25 a 35%, enquanto que em solos úmidos foi de 70 a 80%. (AHARONSON & KAFKAFI, 1975). O carbendazim aplicado em três solos, desapareceu mais rapidamente durante os quatro primeiros meses, enquanto que nos últimos três meses, quase não houve modificação no nível do resíduo. Foi detectado 2-AB, embora em quantidades muito pequenas, além disso foi observado também que o aumento de 2-AB foi maior em solo seco, quando comparado ao solo úmido. KAJFOSZ (1977), citado por RAJAGOPAL *et al.* (1984b), confirmou que o carbendazim adicionado ao solo, diminuiu do nível original de 6 μg/g, para 3 μg/g, nos três primeiros meses, após a aplicação, sem nenhum decréscimo posterior durante os próximos seis meses. Ocorre também em solos a transformação do tiofanato-metílico em carbendazim de acordo com FLEECKER *et al.* (1974). Esta transformação no solo foi quatro vezes mais rápida em pH 7,4 que em pH 5,6. Neste trabalho, foi observado novamente uma estabilidade relativa do carbendazim. O solo incubado por 51 dias com carbendazim radiomarcado, liberava entre 1 a 16% do ^{14}C como $^{14}CO_2$. Foi recuperado, após 43 dias, 53 a 78% do ^{14}C como 2-^{14}C-carbendazim (FLEECKER *et al.*, 1974). SIEGEL (1975), encontrou que em solos argilosos enriquecido com 1% de glicose e 0,5% de extrato de levedura, 21 e 34% do anel ^{14}C em benomil havia sido liberado como $^{14}CO_2$, após incubação de 180 e 340 dias, respectivamente, quando comparado a 16 e 27% em solos não enriquecidos. A baixa liberação de $^{14}CO_2$ indicou que o anel benzimidazóico foi totalmente estável e resistente a completa biodegradação. Já HELWEG (1977) recuperou após 270 dias, 33 e 90% de ^{14}C como $^{14}CO_2$ em solos estéreis e solos não enriquecidos com ^{14}C-carbendazim respectivamente. Após 250 dias, 5 a 13% do ^{14}C adicionado, foi recuperado como carbendazim e 4 a 8% como 2-AB. A

degradação foi mais rápida em solos com aplicações sucessivas. BELANGER (1989), analisando resíduos de pesticidas em óleo de monarda, recuperou somente 0,07μg/ml de benomil, como carbendazim, enquanto que no ano anterior foi recuperado 0,19μg/ml. Este fato ocorreu devido a uma aplicação inicial de 1,12kg de ingrediente ativo, seguida de uma segunda aplicação 14 dias antes da colheita.

Foi curta a persistência de carbendazim aplicado em dois solos, via irrigação por gotejamento (SOLEL *et al.*, 1979) uma vez que, 60 a 80% do fungicida foi perdido entre 1 e 4 semanas, e a degradação foi quase completa dentro de 10 semanas após a aplicação. Em laboratório, o carbendazim resistiu até 9 meses, nos dois solos, mostrando uma meia vida de 4 a 6 meses. O catabolismo mais rápido de carbendazim no campo foi atribuído as altas temperaturas de verão (>30°C) e alcalinidade do solo.

O carbendazim aplicado nas concentrações de 5, 10, 20 e 40μg/g não foi detectado no solo após 3, 5, 8, e 11 meses respectivamente (SINHÁ *et al.*, 1980). Já MUSUMECI *et al.* (1980a) observaram persistência de carbendazim (62 a 86%), em dois solos latossolos mesmo após 300 dias de incubação. O produto de degradação 2-AB foi detectado em maiores quantidades (23%) em um dos solos enriquecido com glicose e extrato de levedura. A degradação de carbendazim foi mais rápida em solos ricos em matéria orgânica (MUSUMECI *et al.*, 1980b). Após 150 dias de incubação, 2-AB foi o principal produto de degradação detectado.

O 2-AB foi instável no solo, decompondo rapidamente após um intervalo de três semanas, contudo, pequenas quantidades permaneceram no solo por muitas semanas, presumivelmente pela adsorção às partículas do solo (HELWEG, 1977). O desprendimento máximo de $^{14}CO_2$ à partir de ^{14}C-2-AB, foi à 22°C, e permaneceu constante entre 25° e 30°C. Todavia, a 40°C, o desprendimento de $^{14}CO_2$ foi insignificante (HELWEG, 1979). A mineralização de 2-AB (desprendimento de $^{14}CO_2$) mostrou um aumento experimental de acordo com o aumento do conteúdo de água, de 28 a 94% da capacidade de campo do solo. Porém, o desprendimento de $^{14}CO_2$ foi comparativamente menor em solos com a quantidade de água acima de 94% da capacidade de campo.

Não há literatura sobre a persistência de benomil em água, porém os dados de JOHNSON & LAVY (1994) demonstram que embora seja persistente no solo, a probabilidade do carbendazim chegar às camadas mais profundas do solo é pequena, devido a sua característica de forte adsorção e baixa solubilidade na solução do solo.

3.4. DEGRADAÇÃO QUÍMICA X MICROBIANA DOS BENZIMIDAZÓIS

Os mecanismos exatos para a adaptação microbiana às moléculas de pesticidas no solo ainda não estão completamente elucidados. Estes processos poderiam ser observados através de aspectos ecológicos e de população, de suas reações bioquímicas e enzimáticas, ou dos aspectos genéticos, nos quais elementos extracromossômicos podem estar envolvidos como parte do processo (AHARONSON *et al.*, 1990).

São limitadas as informações sobre degradação microbiana de benomil ou carbendazim. O benomil é instável em soluções aquosas ou solventes orgânicos (CHIBA & DOORNBOS, 1974; CLEMONS & SISLER, 1969; KILGORE & WHITE, 1970) e em solos (HELWEG (1973), contudo, o carbendazim é persistente e resistente a degradação. O benomil umedecido libera um composto volátil, o butilisocianato (HAMERSCHLAG & SISLER, 1973). Posteriormente, este composto é degradado para n-butilamina. Em condições alcalinas, o benomil é transformado via 3-butil-s-triazino-(1,2)-benzimidazol-2,4-(1H,3H)-diona (STB), para 2-(3-butilureído) -benzimidazol (BUB), enquanto que o carbendazim em condições semelhantes é convertido em 2-AB (BAUDE *et al.*, 1973 e WHITE *et al.*, 1973).

Os microrganismos têm sido comprometidos na degradação do benomil e do carbendazim, baseados em estudos de persistência em sistemas estéreis e não estéreis (HELWEG, 1973; HELWEG , 1977 e SIEGEL, 1975).

A primeira alusão de degradação microbiana foi mencionada a partir de estudos onde foi observado uma rápida perda de benomil em solo o que poderia ser atribuído à lixiviação ou absorção pela planta. Em laboratório, esta rápida perda do fungicida foi observada quando os solos haviam sido previamente tratados com benomil ou

carbendazim. Não houve perdas do fungicida em solos irradiados com raios gama, ou que não foram tratados previamente com benomil (WOODCOCK, 1978).

Muitas espécies bacterianas pertencentes aos gêneros *Achromobacter* e *Flavobacterium* foram isoladas em solos enriquecidos com benomil (SMITH & WORTHING, 1975; SPENCER *et al.*, 1972 e WEEKES & HEDRIC, 1971), mas não foi observada a capacidade destes microrganismos em degradar este composto, com a clivagem do anel benzimidazóico. Da mesma forma, o anel heterocíclico benzimidazóico do carbendazim ou de benzimidazóis relacionados, resistiu a clivagem pelos fungos, durante o metabolismo (DAVIDSE, 1976; VALENTA *et al.*, 1974 e YASUDA *et al.*, 1973). Há poucos exemplos, da degradação pelos microrganismos, com aparente clivagem da metade heterocíclica (FLEECKER *et al.*, 1974; HELWEG, 1977 e SIEGEL, 1975). De acordo com HELWEG (1977), o fungicida foi raras vezes utilizado pelos microrganismos como fonte de energia, possivelmente pelo fato do núcleo benzimidazoico ser degradado por co-metabolismo. Para outros autores como, ROUCHAUD *et al.* (1974 , 1977a,b) e SOLEL *et al.* (1973), as plantas também são responsáveis pela clivagem do anel benzimidazol, porém segundo VONK & KAARS SIJPESTEIJN (1977), a decomposição fotoquímica contribui para a clivagem do anel.

HELWEG (1979) responsabilizou os microrganismos no aumento da degradação de 2-AB, em solos enriquecidos com este composto por seis meses. Segundo o mesmo autor (1972 , 1973), quatro linhagens bacterianas e duas linhagens fúngicas, isoladas em solos de jardim tratados com benomil, utilizaram o fungicida como fonte de carbono e nitrogênio e degradaram o composto após dois meses de incubação. FUCHS & DE VRIES (1978 a, b), encontraram que culturas mistas de *Pseudomonas* spp, isoladas em solo tratado com benomil, efetuavam mais rapidamente a sua degradação do que as culturas puras. As *Pseudomonas* spp utilizaram o benomil e carbendazim como única fonte de carbono. O grupo n-butilcarbamoil, da cadeia lateral de benomil, fornecia principalmente ou exclusivamente, o carbono para a energia microbiana (FUCHS & DE VRIES, 1978b).

Em meio basal tamponado, suplementado com solo tratado com benomil, o carbendazim marcado começava a decrescer após 10 dias e quase desaparecia aos 40 dias.

Concomitantemente havia formação de 2-AB radioativo, alcançando a concentração máxima aos 24 dias, diminuindo após 35 dias. A análise Budget demonstrou que o 2-AB foi convertido subseqüentemente a CO_2 (65%) e 2-AB nucleotídeo. Após 40 dias a maior parte da radioatividade encontrada no meio foi relacionada a 2-AB nucleotídeo. A análise total, conclusiva, demonstrou clivagem do anel do núcleo benzimidazol de 2-^{14}C-carbendazim para $^{14}CO_2$. Segundo FUCHS & DE VRIES (1978b), a proporção de degradação do benomil e carbendazim é baixa, sendo que o composto parental benomil foi recuperado em quantidades substanciais mesmo após 80 dias de incubação.

Baseados na literatura disponível sobre a persistência e na degradação de benomil e carbendazim, RAJAGOPAL *et al.* (1984b) propuseram um caminho para a degradação do benomil no solo e em culturas microbianas (Figura 2).

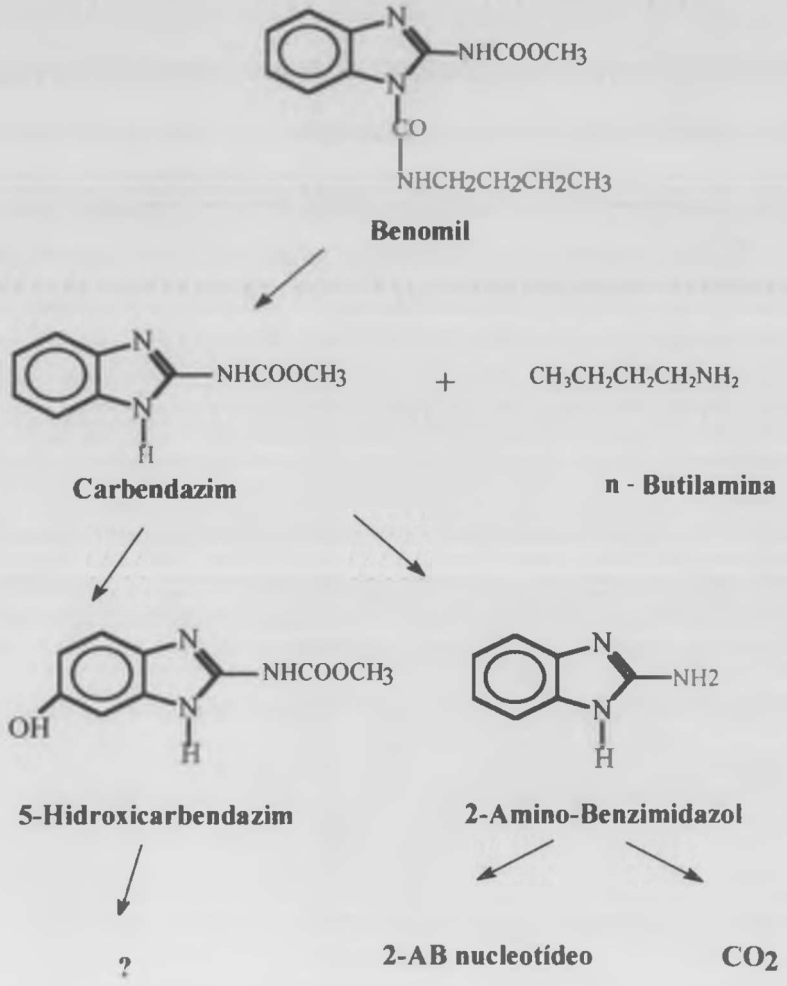


Figura 2. Rota da degradação de Benomil no solo e em culturas microbianas (RAJAGOPAL *et al.* 1984b)

A adaptação da população microbiana a uma variedade de químicos, no ambiente, é a mensuração da sensibilidade ou insensibilidade aos químicos que poderiam ser tóxicos. O fenômeno da degradação acelerada de pesticida, induzida pela aplicação prévia do mesmo composto, foi explicada pela adaptação de um componente específico da comunidade microbiana, a qual resulta numa atividade competitiva e subsequente proliferação. Este fenômeno de adaptação pode ser resultado de interações entre o solo, pesticida, microrganismo e condições ambientais (SOMASUNDARAM & COATS, 1990).

YARDEN *et al.* (1987) e YARDEN *et al.* (1990), observaram que as taxas mais altas de degradação de carbendazim foram em solos tratados previamente com benomil, indiferente ao tipo de solo, cultivo, método de aplicação e outros fatores. Esta degradação acelerada também foi evidente no campo onde houve aplicação foliar do fungicida. Isto indica que mesmo baixas doses do pesticida são suficientes para condicionar o solo à degradação acelerada do mesmo composto. YARDEN *et al.* (1985) observaram, em solos que recebiam aplicações constantes de benomil, em condições de campo, um aumento na degradação deste composto, 2 meses após a colheita.

Ao mesmo tempo que as aplicações repetidas de pesticidas aumentaram sua velocidade de degradação, outras práticas agrícolas como a desinfestação diminuíram esta velocidade (YARDEN *et al.*, 1985). Os solos desinfestados com brometo de metila, solarização ou esterilização em autoclave apresentaram um aumento de persistência de carbendazim, após o tratamento. Por outro lado, os autores observaram que também os fungicidas thiram e fentin acetato inibiram a degradação de carbendazim. Como os pesticidas mencionados suprimem principalmente a população fúngica no solo, os resultados obtidos validam a importância dos fungos na degradação de carbendazim e benomil.

O aumento da degradação dos pesticidas não só resulta da aplicação freqüente do mesmo composto, mas também da capacidade de degradação adquirida devido ao contato com outros pesticidas estruturalmente relacionados.

Segundo HELWEG (1977), a degradação de carbendazim e benomil é principalmente microbiana, porém uma certa proporção poderia ser imobilizada por processos não biológicos. Os processos que causam uma rápida degradação do pesticida

ativo em metabólitos não tóxicos, são essenciais para a manutenção de um ambiente seguro e não poluído.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado nos Laboratórios de Microbiologia e Análise de Resíduos do Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental - CNPMA/Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, em Jaguariúna - SP.

4.1. **REAGENTES**

4.1.1. Fungicida carbendazim (metil-benzimidazol-2-il-carbamato), padrão analítico com 99% de pureza, e o correspondente grau técnico, lote D033, com 99% de pureza, cedidos pela Empresa Hoechst, São Paulo, SP.

4.1.2. 2-amino-benzimidazol, padrão analítico com 99% de pureza, Lab. Dr. Ehrenstorfer.

4.1.3. Acetato de etila, para análise de resíduos, com 99% de pureza.

4.1.4. Fosfato de amônio monobásico, para análise em CLAE, 99% de pureza.

4.1.5. Ácido clorídrico fumegante, para análise.

4.2. EQUIPAMENTOS

Os procedimentos analíticos foram conduzidos utilizando um cromatógrafo líquido marca Shimadzu modelo LC-10AD, acoplado a um detector de ultra-violeta com conjunto de fotodiodos, marca Shimadzu modelo SPD-M6A, equipado com um sistema deliberador de solvente, um autoinjetor Shimadzu modelo SIL-10A e um forno Shimadzu modelo CTO-10A.

As amostras foram agitadas em agitador orbital Lab-line, sob temperatura de 28°C ± 1°C, a 150 rotações por minuto e, evaporadas em rotavaporador Rinco, industrializado pela Valley Eletromagnetics Corp., em banho termostatizado à temperatura de 45°C.

Foi utilizado microscópio ótico, equipado com oculares com capacidade de aumento de 10X, objetivas secas de baixa magnificação (10X, 25X, 40X), objetiva acromática para óleo de imersão (100X), estativa móvel, condensador e fonte de luz com ajuste de intensidade luminosa.

4.3. MICRORGANISMOS UTILIZADOS

O fungo *Alternaria alternata*, isolado neste trabalho, do solo do município de Guaíra- SP, foi identificado pela Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Tosello" e selecionado para os estudos de biodegradabilidade do fungicida carbendazim.

Alternaria alternata, linhagens CCT 1250 e CCT 3823, foram cedidas pela Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Tosello" como padrões para estudos de comparação com a linhagem degradadora.

4.4. SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS

4.4.1. SOLUÇÃO PADRÃO DE CARBENDAZIM

Foram pesadas e dissolvidas 0,01g de carbendazim, padrão analítico, em 100 ml de água acidificada por ácido clorídrico fumegante. A solução padrão resultante contém

100µg/ml de carbendazim. Soluções diluídas em fase móvel foram preparadas a partir da solução padrão de carbendazim de 100µg/ml, para a obtenção das curvas de calibração das determinações analíticas.

4.4.2. SOLUÇÃO DE CARBENDAZIM PARA TESTE DE BIODEGRADABILIDADE

Para avaliar a biodegradação de carbendazim, foi utilizada uma solução estoque do fungicida de 9147µg/ml. Desta solução foram retiradas alíquotas equivalentes a 100µg/ml para a suplementação do meio de cultura.

4.4.3. FASE MÓVEL

Com relação à fase móvel para preparar a solução de 0,0125M de fosfato de amônio, foram pesados e dissolvidos 1,43g do químico em um litro de água.

4.4.4. MEIO MÍNIMO (MM) (PONTECORVO *et al.*, 1953)

GLICOSE.....10g
$NaNO_3$.....6,0g
KH_2PO_4.....1,5g
KCl.....0,5g
$MgSO_4$.....0,5g
$FeSO_4$.....0,02g
$ZnSO_4$.....0,01g
Ágar.....15,0g
Água destilada.....1000ml

pH ajustado para 6,8 com NaOH 4%

4.4.5. MEIO COMPLETO (MC) (PONTECORVO *et al.*, 1953; modificado por AZEVEDO & COSTA, 1973). Foram acrescentados ao MM:

Peptona.....2,0g
Extrato de levedura.....2,0g
Caseína hidrolisada.....1,5g
Solução vitaminada.....1,0ml

4.4.6. MEIO BATATA- DEXTROSE-AGAR (BDA):

Caldo de batata.....200ml
Dextrose.....20g
Ágar.....15g
Água destilada.....1000ml

4.4.7. MEIO BATATA-DEXTROSE 50%

Caldo de batata.....100ml
Dextrose.....10g
Água destilada.....1000ml

4.4.8. AVEIA - ÁGAR:

Aveia.....40g
Ágar.....16g
Água destilada.....1000ml

4.4.9. SABOURAUD:

Proteose-peptona.....10g
Maltose.....40g
Extrato de levedura.....1g
Ágar.....16g
Água destilada.....1000ml

4.4.10. SUCO V-8:

Suco de Tomate.....100ml
$CaCO_3$.....2g
Ágar.....15g
Água destilada.....1000ml

4.4.11. ÁGAR-MALTE:

Extrato de malte.....25g
Ágar.....20g
Água destilada.....1000ml

4.4.12. CZAPECK:

$NaNO_3$.....3g
K_2HPO_4.....1g
$MgSO_4.7H_2O$.....0,5g
KCl.....0,5g
$FeSO_4.7H_2O$.....0,01g
Sacarose.....30g
Ágar.....16g
Água destilada.....1000ml

4.4.13. MEIO SINTÉTICO BÁSICO (MSB):

NaCl.....0,5g
K_2SO_4.....0,35g
Mg-glicerofosfato.....0,25g
Ca-glicerofosfato.....0,25g
Elementos traços.....5 ml
pH.....5,0
Água destilada.....1000ml

*ELEMENTOS TRAÇOS (por litro)

$FeCl_3$	10mg
$MgCl_2.4H_2O$	10mg
$ZnSO_4.7H_2O$	5 mg
$CuSO_4.5H_2O$	1 mg
MoO_3	0,5mg
H_3BO_3	0,25mg

FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO adicionadas ao MSB:

D-ribose	60mM
D-arabinose	60mM
D-glucose	60mM
D-frutose	60mM
D-galactose	60mM
Sorbitol	60mM
Manitol	60mM
Inositol	60mM
Sucrose	30mM
Celobiose	30mM
Maltose	30mM
KNO_3	19mM
NH_4Cl	37mM
Glutamina	13mM

4.4.14. SOLUÇÃO SALINA (0,85%)

NaCl	8,5g
Água destilada	1000ml

4.4.15. SOLUÇÃO DE "TWEEN-80" (0,1% V/V)

"Tween -80"	0,1ml
Água destilada	99,9ml

A solução foi autoclavada e mantida em refrigerador a 4°C.

4.5. ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DEGRADADORES DE BENOMIL

Avaliaram-se três diferentes solos (1, 2 e 3) provenientes de áreas de agricultura irrigada do município de Guaíra-SP, onde é prática comum o uso intensivo de pesticidas. Para o desenvolvimento de microrganismos degradadores do fungicida benomil, foram adicionados às amostras de solos, em laboratório, 50µg/g do princípio ativo de

benomil. Estas amostras foram reumedecidas e incubadas durante 30 dias em condições de temperatura ambiente. O controle constou de solos não tratados com benomil.

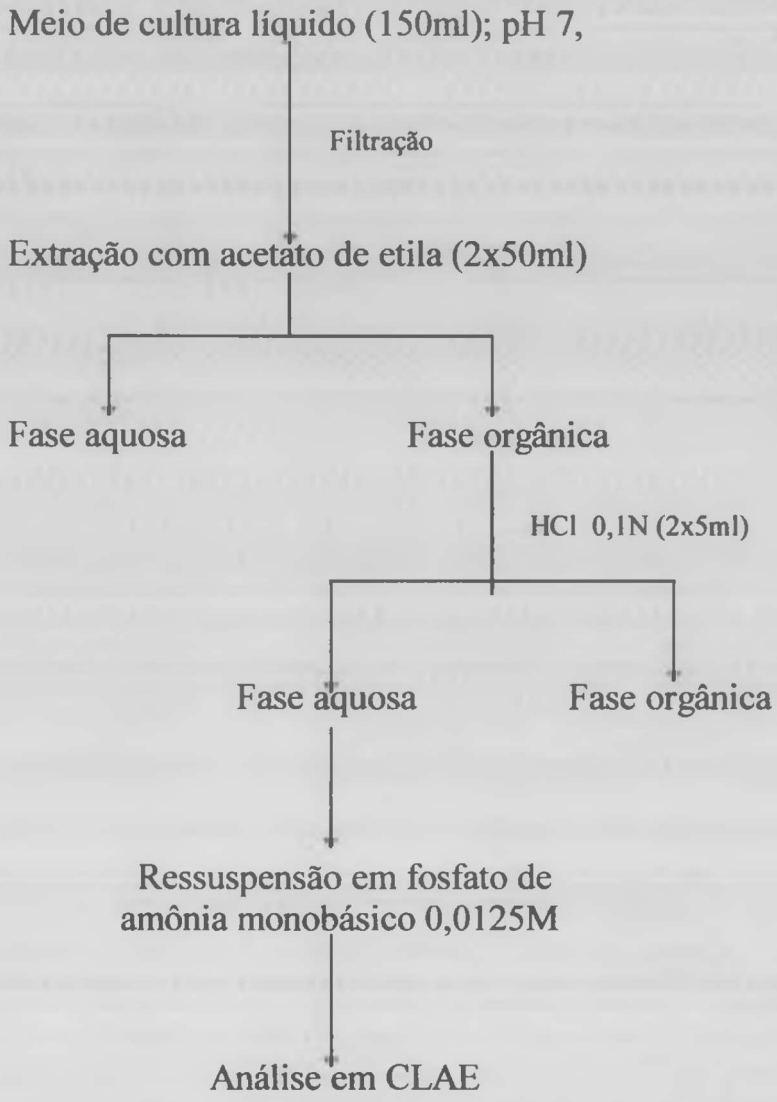
Sub-amostras de solo seco ao ar (1g) foram suspensas em 9ml de solução salina esterilizada e foram agitadas durante duas horas. Após este período foram realizadas diluições em série. Alíquotas de 0,1ml, retiradas das concentrações 10^3 e 10^4 foram semeadas em placas de Petri contendo meio mínimo (MM) suplementado com 50μg/g de benomil como fator seletivo. Após a incubação das culturas no escuro a 28°C durante sete dias, foram contadas as colônias desenvolvidas.

As colônias fúngicas que se desenvolveram foram repicadas para placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), suplementado com diferentes concentrações de benomil: 10, 20, 50 e 100μg/g. A testemunha constou de meio BDA sem benomil. Foi avaliado o desenvolvimento das colônias durante oito dias tomando-se valores do diâmetro em dois sentidos perpendiculares. O delineamento estatístico foi fatorial 3x2 com três repetições.

4.6. **RECUPERAÇÃO DOS RESÍDUOS DE CARBENDAZIM**

Para validação do método analítico, foram estabelecidas as porcentagens de recuperação dos resíduos de carbendazim. Estas foram determinadas em erlenmeyers contendo 150ml de meio de cultura batata-dextrose (BD-50%) e suplementados com 100μg/ml de carbendazim. Foram incubados sob agitação em agitador orbital a 28°C ± 1°C por períodos de 2, 4, 7, 15 e 30 dias.

A determinação quantitativa dos resíduos fungitóxicos, realizada a partir do segundo dia, foi conduzida por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando-se uma coluna de troca catiônica e detecção por ultra-violeta, após extração e purificação das amostras. As etapas deste processo seguiram a metodologia descrita por AUSTIN & BRIGGS (1976):



Procedeu-se a análise cromatográfica utilizando-se uma coluna de troca catiônica nas seguintes condições: temperatura da coluna: 40°C; fase móvel: fosfato de amônio 0,0125M com fluxo de 0,2ml por minuto e detector de absorbância operando a 280nm. Sob estas condições, o tempo de retenção de carbendazim e 2-amino-benzimidazol foi de aproximadamente 4,5 e 6,3 minutos, respectivamente. A quantificação foi feita utilizando-se regressão linear de curvas de calibração obtidas com soluções padrões de carbendazim versus a resposta (altura ou área do pico), obtida no cromatograma. Assim foi assumido que para um determinado intervalo de concentração, a resposta é linear obedecendo a equação abaixo:

$y = b + mx$

as constantes b (intersecção) e m (coeficiente de regressão) podem ser encontradas através de regressão linear no intervalo observado.

x = quantidade do composto injetado em µl (microlitro) em parâmetros constantes do CLAE

y = resposta do cromatógrafo

As curvas foram obtidas com pelos menos cinco pares de concentração x resposta e foram obtidas para cada determinação efetuada. A quantidade em µg/ml (ppm) de carbendazim nas amostras foi então calculado da seguinte forma:

$$\mu g/ml \text{ encontrado} = \frac{(x,\mu g).(vol.\ f.).(f.\ dil.)}{(vol.i.).(vol.\ inj.)}$$

onde:

x,µg = área do pico obtida no cromatógrafo

vol. f. = volume em ml no qual são dissolvidas as amostras antes da análise cromatográfica

vol. inj. = volume injetado no cromatógrafo, em µl

f. dil. = fator de diluição das amostras

vol. i. = volume inicial da amostra em ml.

Porcentagem de recuperação

Em amostras fortificadas a porcentagem de recuperação foi calculada de seguinte forma:

$$\% \text{ recuperação} = \frac{\mu g/ml \text{ encontrado} \times 100}{\mu g/ml \text{ adicionado}}$$

4.7. AVALIAÇÃO DA BIODEGRADABILIDADE DE CARBENDAZIM

Para verificar a degradação de carbendazim pelo microrganismo selecionado nos experimentos anteriores (*Alternaria alternata*), sem a participação de interferentes

como partículas do solo, transferiu-se o fungo para um meio de cultura líquido (BD-50%) suplementado com 100µg/ml de carbendazim. Inicialmente foi testado meio de cultura mineral, porém mesmo com o meio acrescido de 10µg/ml de extrato de levedura não houve desenvolvimento do fungo. Após vários testes, utilizando-se diferentes substâncias como nutriente, decidiu-se pela utilização do meio de cultura batata-dextrose (BD), tendo neste caso excelente crescimento das colônias.

Os frascos com os microrganismos crescidos foram utilizados para repiques em frascos contendo BD+carbendazim (100µg/ml). Este procedimento foi repetido por quatro repiques consecutivos, incubando os frascos por cerca de sete dias entre cada repique. Após o quarto repique os frascos foram incubados nas mesmas condições do experimento de recuperação dos resíduos de carbendazim, isto é, sob agitação em agitador orbital a 28°C± 1°C por períodos de 2, 4, 7, 15 e 30 dias.

A determinação quantitativa dos resíduos fungitóxicos, realizada a partir do segundo dia, foi conduzida por cromatografia de alta eficiência (CLAE), utilizando-se uma coluna de troca catiônica e detecção por ultra-violeta, após extração e purificação das amostras. As etapas deste processo seguiram a metodologia descrita no item 4.6.

4.8. CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (ccd)

Para avaliação qualitativa, da biodegradabilidade de carbendazim por *A. alternata*, através de ccd, as amostras crescidas em meio de cultura (BD-50%) suplementados com carbendazim (100µg/ml) e inoculados com *A. alternata* foram incubadas, extraídas e purificadas de acordo com a metodologia já descrita anteriormente. A amostra testemunha constou somente de meio de cultura (BD-50%) suplementado com carbendazim (100µg/ml).

Os extratos concentrados foram aplicados em placas de sílica-gel/ UV_{254} (Whatman). Foram aplicados quatro pontos, considerando a quantidade máxima de 10µg para cada ponto. Padrões analíticos de carbendazim e 2-amino-benzimidazol foram utilizados como referências.

A mistura de solventes utilizada para o desenvolvimento das placas de sílica-gel foi clorofórmio: acetato de etila: ácido acético, nas proporções 190:10:4 (v/v/v). As manchas desenvolvidas foram identificadas sob luz-ultravioleta (254nm). Para o cálculo do RF (distância percorrida pela substância teste) foi utilizada a seguinte equação:

$$Rf = \frac{\text{distância percorrida pela substância teste}}{\text{distância do solvente}}$$

4.9. ESTIMATIVA DA BIOMASSA DE *A. ALTERNATA*

A avaliação da biomassa microbiana ocorreu paralelamente ao experimento de biodegradabilidade, sob as mesmas condições de incubação. O fungo *A. alternata* foi inoculado em erlenmeyers contendo 100ml de meio de cultura BD (50%) suplementado ou não com carbendazim (100µg/ml). Diariamente, durante uma semana, foram retiradas amostras para a determinação da biomassa. A massa micelial formada foi filtrada em funil de Büchner e seca em estufa a 55°C até peso constante. Para minimizar o efeito da transferência do inóculo de um frasco para outro (efeito sobre a velocidade de divisão celular), foram utilizados inóculos de *A. alternata* produzidos em meio de cultura semelhante ao utilizado para quantificar a biomassa. O experimento constou de três repetições.

4.10. REQUISITOS NUTRICIONAIS

4.10.1. Seleção de meios de cultura para crescimento e esporulação

O experimento visando a caracterização morfológica quanto ao crescimento e esporulação foi desenvolvido utilizando-se a linhagem de *A. alternata* selecionada na fase anterior. Discos de meio de cultura contendo micélio com 0,7cm de diâmetro, foram colocados no centro de placas de Petri contendo diferentes meios de cultura: Batata-dextrose-ágar (BDA), Czapeck, Sabouraud, Aveia- ágar, Suco V-8, Ágar- malte e Meio Completo (PONTECORVO, 1953). As culturas foram incubadas em condições de

temperatura ambiente. A avaliação do crescimento foi realizada durante sete dias após, tomando-se valores do diâmetro nos dois sentidos perpendiculares, através de uma régua milimetrada aplicada no reverso da placa. O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado com cinco repetições.

A avaliação da esporulação, foi efetuada no décimo dia de incubação, em suspensão de conídios. Esta suspensão foi formada pela adição de cinco discos de meio de cultura contendo micélio (0,7cm de diâmetro), em 10ml de uma solução de "Tween 80" 0,1%. O número de conídios foi quantificado com auxílio da câmara de Neubauer.

Uma vez determinado o melhor meio de cultura para crescimento microbiano procedeu-se a avaliação de diferentes fotoperíodo para o crescimento e esporulação de *A. alternata*. Para isto, o fungo foi cultivado em meio de cultura suco V-8 sob diferentes regimes de luz, quais sejam: luz fluorescente (luz do dia), 40 watts, contínua; 12 horas de luz fluorescente e 12 horas de escuro; 12 horas de luz próxima a ultra-violeta, 40 watts, lâmpada marca Phillips, colocada a 30 cm de altura e 12 horas de escuro e total ausência de luz. O procedimento para avaliação do crescimento teve início no segundo dia de incubação, seguindo até o sétimo dia. A avaliação deu-se pelas medidas do diâmetro da colônia em dois sentidos perpendiculares. A quantificação da esporulação foi efetuada em câmara de Neubauer, pela contagem dos conídios como anteriormente descrito.

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado com cinco repetições.

4.10.2. **Influência de fontes de carbono, nitrogênio e vitaminas sobre o crescimento de *A. alternata.***

Para encontrar um meio sintético adequado para o crescimento e esporulação de *A. alternata* foram semeados discos (0,7 cm de diâmetro) contendo micélio desta linhagem, em meio de cultura acrescido de diferentes fontes de carbono, nitrogênio e vitaminas.

Várias fontes de carbono e nitrogênio foram testadas separadamente no meio sintético.

EMBRAPA
AINFO / CNPMA

Para determinar a necessidade de vitaminas, ou fatores de crescimento, o meio sintético básico foi suplementado com glicose e NH_4Cl. As vitaminas adicionadas ao meio foram: piridoxina (hidroxilato de piridoxina), biotina e tiamina (hidroxilato de tiamina).

O crescimento radial e a esporulação foram avaliados conforme metodologia anteriormente descrita. O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado com seis repetições.

4.10.3. **Caracterização citológica**

Foram realizadas observações citológicas pela coloração de núcleos. A linhagem de *A. alternata,* foi previamente cultivada em suco V-8, por 14 dias sob alternância de luz (12 horas de luz fluorescente, 12 horas de escuro) a 28°C, para produção de conídios. Como descrito pelo método de TANAKA (1979), os conídios foram aderidos às lamínulas através de uma solução de albumina. Foram fixados pela solução álcool : ácido-acético (3:1), durante 30 minutos à temperatura ambiente. A hidratação foi efetuada por tratamento sucessivo em álcool 95% e 70%, sendo hidrolizados em seguida em ácido clorídrico 1N a 60°C. O tempo de hidrólise foi de 25 minutos. Os conídios foram corados por imersão em solução de Giemsa diluída com tampão fosfato 0,02M, pH 7,0 (1: 6), durante 15 minutos. Foi retirado o excesso de corante através da lavagem com o mesmo tampão. A avaliação foi feita através da contagem do número e tamanho (comprimento e largura) dos núcleos por conídios, bem como do tamanho (comprimento e largura) dos conídios. Foram avaliados um total de 100 conídios.

4.11. ANÁLISE ELETROFORÉTICA PARA OS PADRÕES DE PROTEÍNAS TOTAIS E ESTERASES.

Discos de meio de cultura contendo micélio (0,7cm de diâmetro) da linhagem de *A. alternata* selecionada como degradador de carbendazim e outras duas linhagens fitopatogênicas (CCT 1250 e CCT 3823) foram inoculados em frascos Erlenmeyers de 250ml, contendo 100ml de meio BD com diferentes concentrações de

carbendazim (0, 10 e 100μg/ml) e incubadas durante 15 dias. Após este período, o crescimento micelial foi recuperado por filtragem a vácuo em funil de Büchner para então ser liofilizado à temperatura de -45°C e à pressão de 6 x 10^{-1} mmHg. Para a caracterização bioquímica, as amostras foram preparadas de acordo com a metodologia descrita por PACCOLA- MEIRELES et al. (1988).

O gel de poliacrilamida foi confeccionado a 10% de acordo com PACCOLA-MEIRELES *et al.* (1988). A amperagem foi mantida constante a 133mA por 4 horas. A corrida eletroforética foi mantida a 4°C para prevenir a desnaturação pelo calor e a perda da atividade enzimática. A migração, tendo iniciado no ponto de aplicação da amostra, foi de 12cm e 14,5cm para os sistemas esterase e proteínas totais, respectivamente. Os géis foram retirados das placas e incubados em solução corante respeitando os diferentes sistemas.

4.12. TESTE DE PATOGENICIDADE DO ISOLADO DE *ALTERNARIA ALTERNATA*

O isolado de *Alternaria alternata* foi cultivado em meio de cultura suco V-8 a 28°C sob alternância de luz (12 horas de luz fluorescente, 12 horas de escuro), até o décimo quinto dia. A suspensão de conídios (10^6 conídios/ml) foi obtida com a adição de água destilada esterilizada sobre a colônia, removendo-se os conídios com auxílio de um pincel.

Duas metodologias foram utilizadas para a inoculação nas plantas: a) Impressão datilocárpica: a penetração da suspensão fúngica nas folhas foi feita através da pressão dos dedos indicador e polegar embebidos na suspensão ; e, b) inoculação através de perfuração: foi utilizado um inoculador com 5 pontas, para a perfuração em vários pontos das folhas, embebido na suspensão de conídios de *A. alternaria.*

As plantas inoculadas foram: mamão (*Carica papaya)*, feijão (*Phaseolus vulgaris* var. carioquinha), tomate (*Lycopersico esculentum* var. petomec), goiabeira (*Guava sativa*), capim limão (*Cymbopogon citratus*), plantas jovens e adultas de fumo (*Nicotiana tabacum*), e plantas daninhas como: soja perene (*Glycine wightii*) e guanxuma (*Sida glaziovii*).

As inoculações foram relizadas no período da tarde. As plantas foram incubadas em casa de vegetação e permaneceram 24 horas em câmara úmida à temperatura ambiente (27° a 30°C). As plantas testemunhas foram inoculadas somente com água destilada esterilizada. O experimento constou de três repetições, considerando a planta toda ou em folhas, dependendo do caso.

As avaliações foram realizadas sete dias após as inoculações, observando-se presença ou ausência de sintomas do tipo lesão.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS RESISTENTES AO BENOMIL

Observou-se um comportamento diferenciado das amostras de solo testemunha em relação as amostras de solo incubadas por 30 dias com 50 µg/g de benomil. Nas culturas provenientes de solos não suplementados com benomil não houve desenvolvimento de colônias, enquanto que, nas culturas de solos suplementados com benomil, como única fonte de carbono e energia, uma maior população de microrganismos (6,4 x 10^4/g de solo) entre bactérias, fungos e actinomicetos, foi observado na amostra do solo 3, indicando adaptação da população microbiana para a utilização do fungicida. As amostras de solos 1 e 2 apresentaram uma população microbiana de 3,3 x 10^4 e 6,2 x 10^4/g de solo, respectivamente. Considerando-se que as amostras de solo foram coletadas na mesma região geográfica, os resultados demonstraram pequenas variações secundárias, que determinaram a presença ou não de uma determinada atividade microbiologica. Também a diferença na composição da biomassa microbiana do solo, determinou a extensão do efeito do pesticida.

Treze isolados fúngicos, com características morfológicas distintas, que cresceram abundantemente no meio BDA com benomil foram purificados e transferidos para o meio com diferentes concentrações de benomil. Um isolado de *A. alternata* apresentou um crescimento mais rápido, diferindo significativamente ($P > 0,01$) dos

demais (Tabela 1). Em relação aos demais fungos, foram observadas diferenças significativas (P > 0,01) entre as concentrações estudadas, havendo um decréscimo progressivo no crescimento de todos os organismos, com o aumento da concentração, indicando toxicidade de benomil, nestas concentrações. A linhagem de *A. alternata* (linhagem 13) além de apresentar um crescimento superior, no meio suplementado com benomil, em relação à testemunha, não apresentou diferenças significativas entre as concentrações testadas. Já, a máxima concentração de benomil que permitiu crescimento para todas as linhagens testadas foi de 10µg/g, enquanto as concentrações de 50 a 100µg/g resultaram num efeito negativo, podendo causar um desequilíbrio na população microbiana do solo.

Tabela 1. Diâmetro das linhagens fúngicas crescidas em BDA, em diferentes concentrações de benomil, após oito dias de incubação. Média de três repetições.

	Concentração de benomil (µg/ml)**				
Linhagem	**0**	**10**	**20**	**50**	**100**
1	9,00a	8,05a	8,50a	6,71a	3,75b
2	9,00a	9,00a	7,62a	2,46b	1,38b
3	7,13a	7,75a	7,71b	1,81c	1,18c
4	9,00a	9,00a	9,00a	2,20b	1,65b
5	9,00a	9,00a	5,41b	3,18c	3,00c
6	9,00a	9,00a	4,40b	1,85c	1,28c
7	9,00a	9,00a	3,80b	2,65b	2,37b
8	9,00a	9,00a	6,66b	4,20c	3,02c
9	9,00a	9,00a	8,31a	2,25b	1,60b
10	9,00a	9,00a	4,73b	1,95c	1,27c
11	9,00a	9,00a	5,48b	3,48c	2,80c
12	9,00a	9,00a	9,00a	8,60ab	6,96b
13	7,85a	7,01a	6,95a	6,51a	6,56a

* Médias do diâmetro das colônias em cm

** Médias seguidas da mesma letra , na mesma coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tuckey a 5% de probabilidade.

PEEPLES (1974), observou que o benomil não alterou a população microbiana de solos tratados no campo com 2,2 ; 22,4 ou 89,6 Kg do ingrediente ativo/ha. Além disso, registrou também que os fungos comuns do solo como *Pennicilium* spp, *Aspergilus* spp e *Trichoderma* spp, apesar de serem sensíveis em meios de cultura

suplementados com benomil, cresciam em populações normais, em solos tratados com benomil, no campo. Por outro lado, SIEGEL (1975) demonstrou que benomil adicionado ao solo, em estudos de 30-35 dias, não causou modificações na população bacteriana, mas reduziu de 2 a 3 vezes o número de fungos e actinomicetos, entretanto as modificações não ocorreram em grande escala (> 10 vezes), nas populações microbianas do solo. SINHÁ *et al.* (1980) e HOFER *et al.* (1971) registraram o efeito tóxico de carbendazim acima de 20μg/ml, e o efeito fungistático do benomil acima de 25μg/ml, respectivamente, enquanto neste estudo observou-se que o efeito tóxico de carbendazim foi acima de 10μg/g. YARDEN *et al.* (1990), ao isolarem a população fúngica de solos com e sem história de carbendazim, observaram que cerca de 40% dos fungos isolados capazes de degradar carbendazim, foram identificados como *Alternaria alternata*, além disso, MOUBASHER *et al.* (1984), verificaram que o benomil foi quase que regularmente tóxico para os fungos do solo, de raiz e da superfície das folhas. Segundo estes autores, a maioria dos fungos foi afetada pelos períodos de aplicação e doses do fungicida, porém *A. alternata* resistiu ao efeito do benomil na maioria dos tratamentos utilizados e, em alguns tratamentos, teve até sua contagem aumentada. Os dados obtidos neste trabalho corroboram com os relatos da literatura, uma vez que o fungo isolado em meio suplementado com diferentes concentrações de benomil foi *A. alternata*. Segundo BOLLEN & FUCHS (1970), os Porosporae são insensíveis ao benomil.

5.2. **RECUPERAÇÃO DOS RESÍDUOS DE CARBENDAZIM**

Devido a instabilidade do benomil em água e solventes orgânicos a maioria dos métodos analíticos descritos para a determinação do benomil usam um caminho indireto. Os métodos descritos normalmente envolvem a conversão quantitativa do benomil para seu produto de degradação carbendazim, que é determinado por técnicas cromatográficas, ou a formação de seus derivados. A desvantagem desses métodos é a superestimação do benomil, uma vez que o carbendazim sendo um produto da degradação de benomil, está presente nas diferentes amostras, juntamente com o benomil e é também determinado como benomil. Uma vez que o carbendazim (MBC) é um composto estável e

de atividade fungicida efetiva (CLEMONS & SISLER, 1969) optou-se aqui em utilizá-lo como substância teste, evitando assim o erro da superestimação.

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados, em porcentagem, da recuperação de carbendazim aplicado nos tratamentos efetuados no experimento de biodegradabilidade, incubados durante 30 dias.

Tabela 2. Recuperação de carbendazim (%) em meio de cultura (BD) suplementado com o fungicida e inoculado ou não com *Alternaria alternata.*

	DIAS					
Tratamentos	**1**	**2**	**4**	**7**	**15**	**30**
meio de cultura+MBC	70,45	75,21	72,86	71,78	70,25	70,93
M.C.+MBC+*A. alternata*	55.52	33,55	29,84	14,85	19,21	13,70

LEGENDA MBC = carbendazim, M C = meio de cultura

Uma vez que as técnicas cromatográficas permitem a separação, quantificação e identificação do composto parental e dos produtos de degradação, pode-se afirmar, considerando que a maioria dos fungicidas benzimidazóis absorvem fortemente a luz ultra-violeta , que o método CLAE fornece uma quantificação altamente seletiva e sensível dos resíduos de carbendazim. Esta seletividade é, em grande parte, resultado da alta eficiência da coluna de troca catiônica usada neste estudo. Estas colunas permitem a determinação de resíduos de MBC e 2-AB por períodos bastante prolongados sem modificações das características cromatográficas.

A confirmação da identidade do pico com um alto grau de confiança foi possível pela comparação do tempo de retenção e o espectro de absorbância em ultra-violeta do carbendazim. A quantidade mínima da amostra determinada, para a obtenção de um espectro ultra-violeta de alta qualidade, foi de 0,3µg/ml para carbendazim e 0,1µg/ml para 2-amino-benzimidazol.

As Figuras 3 e 4 demonstram o espectro de absorbância da molécula de carbendazim em diferentes condições de cultivo de *A. alternata,* indicando índices de similaridade da molécula variando de 0,99 a 1 entre as diferentes amostras (padrão de carbendazim, meio de cultura + carbendazim, meio de cultura + carbendazim + *A. alternata*).

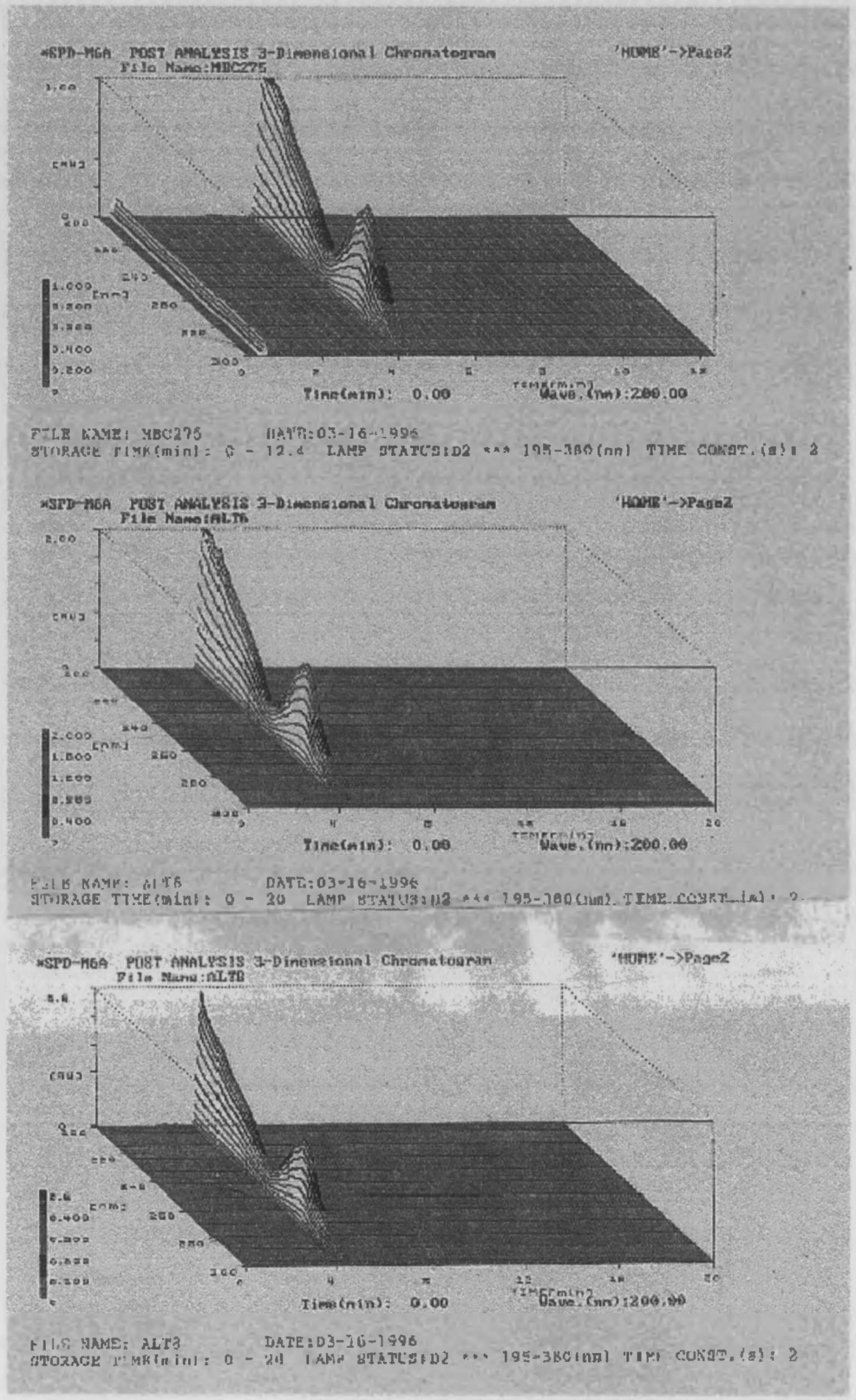


Figura 3. Cromatograma tri-dimensional da molécula de carbendazim em três diferentes condições: A) padrão de carbendazim; B) meio de cultura + carbendazim; C) meio de cultura + carbendazim + *Alternaria alternata*.

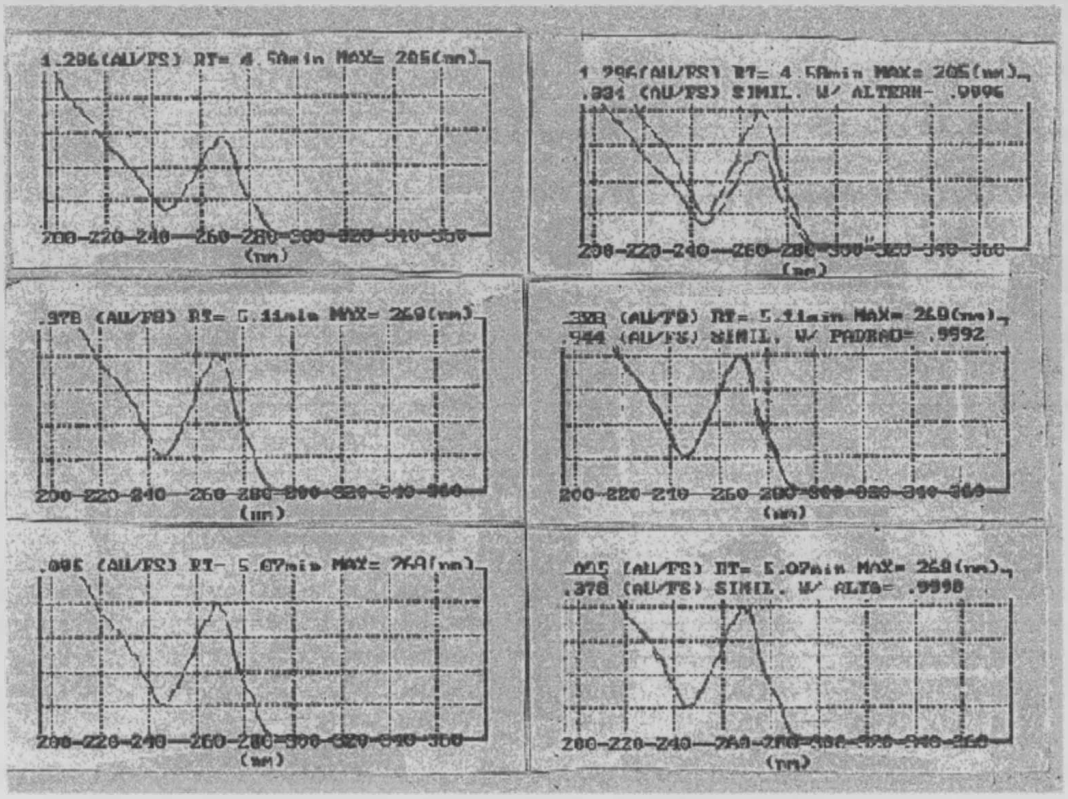


Figura 4. Espectro de absorbância da molécula de carbendazim em diferentes amostras: a) padrão de carbendazim; b) meio de cultura + carbendazim; c) meio de cultura + carbendazim + *Alternaria alternata*; d) índice de similaridade entre a e c; e) índice de similaridade entre a e b; f) índice de similaridade entre b e c.

A Figura 5 mostra o espectro do conjunto de fotodiodo para carbendazim nas diferentes amostras citadas.

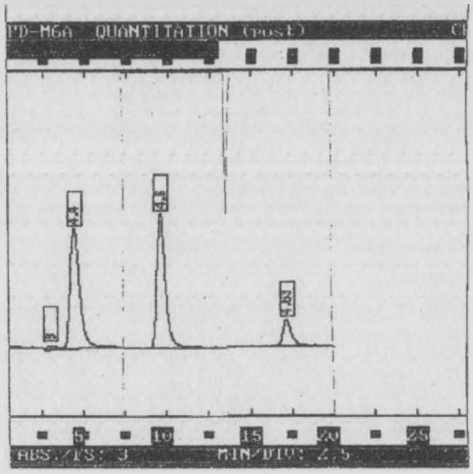
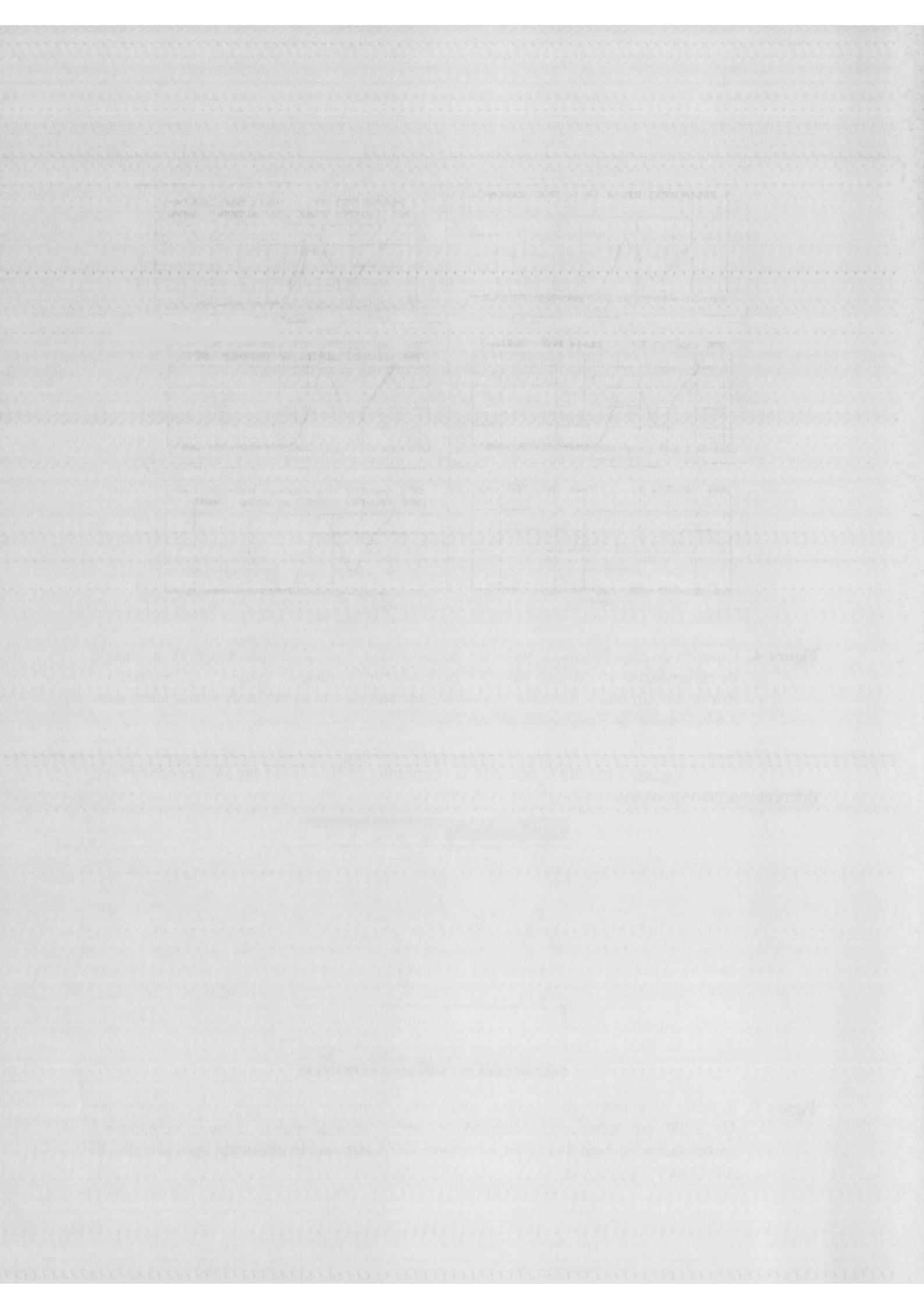


Figura 5. Espectro do conjunto de fotodiodo para carbendazim em cromatograma de absorção por UV a 280 nm, mostrando o carbendazim em: 1) solução padrão; 2) meio de cultura + carbendazim; 3) meio de cultura + carbendazim + ***Alternaria alternata***, após sete dias de incubação.



5.3. AVALIAÇÃO DA BIODEGRADABILIDADE DE CARBENDAZIM

Entre os fungos isolados em meio de cultura com carbendazim, *A. alternata* demonstrou crescimento significativo em altas concentrações do produto e, por este motivo, foi escolhido para o teste de biodegradabilidade.

Observa-se pela Figura 6 que houve rápida degradação de carbendazim por *A. alternata* nos dois primeiros dias de incubação. Esta rápida degradação foi expressada pela alta porcentagem de degradação (66,4%) com um "período lag" consideravelmente pequeno, antes da fase de rápida degradação.

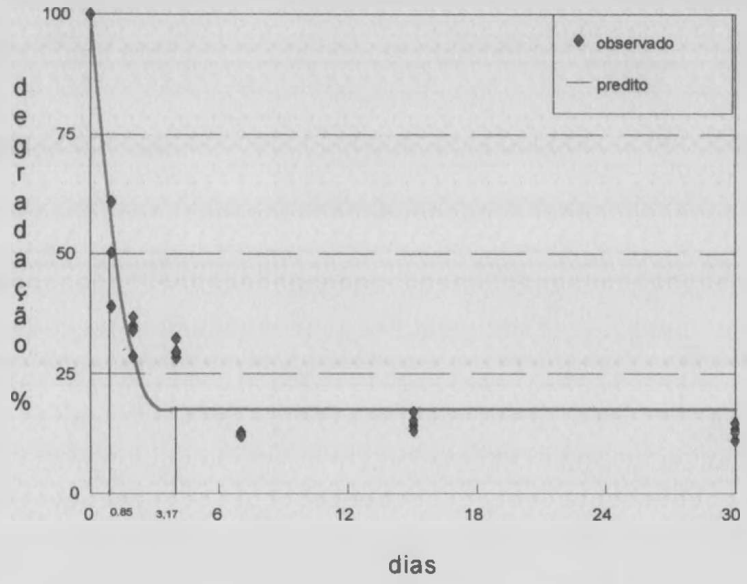


Figura 6. Degradação de carbendazim por ***Alternaria altenata***.

Como pode ser observado pela Figura 6 a degradação ocorreu quase linearmente durante o primeiro dia diminuindo então significativamente, o que permite concluir que a quantidade de carbendazim decresceu a um instante Tc e depois estabilizou. Este fenômeno sugere o uso de um modelo segmentado para a curva de degradação, considerando o instante T=0, onde nada foi degradado, e a quantidade de carbendazim seria 100% da dosagem inicial sem degradação. O modelo proposto para o ajuste do modelo segmentado é:

$$Q(T) \quad 1 + \alpha T + \beta T^2 + E \quad \text{para} \quad T < Tc$$
$$Qc \quad \text{para} \quad T > Tc \qquad (1)$$

onde:

Q (T) = quantidade remanescente (não degradada) de carbendazim no instante T, expressa como porcentagem da quantidade inicial

T = tempo (dias)

Tc = tempo a partir do qual cessa a degradação

Qc = quantidade remanescente a partir do instante Tc

α e β = parâmetros do modelo, ou seja, α é a velocidade de degradação e β é a desaceleração da degradação.

A meia vida do pesticida, estimada a partir do modelo ajustado:

$$Y = \quad 1 - 0{,}52\,t + 0{,}082\,t^2 \quad \text{se} \quad T < 3{,}17$$
$$0{,}17 \quad \text{se} \quad T > 3{,}17$$

a estimativa da meia vida corresponde ao valor de T tal que :

$$1 - 0{,}52\,T + 0{,}082\,T^2 = 0{,}50\,,$$

dessa forma a meia vida estimada foi de 0,85 dias ou seja 20 horas.

A degradação microbiologica dos pesticidas é um processo pelo qual os microrganismos adaptam-se ao pesticida e produzem enzimas capazes de degradá-lo durante a chamada "fase lag" seguida por um período de "enriquecimento" quando os microrganismos adaptados multiplicam-se utilizando o substrato como fonte de carbono (ALEXANDER, 1994).

Quando um pesticida é sujeito a degradação microbiana, sendo aplicado ao solo pela primeira vez, um período de adaptação é usualmente observado, antes que a degradação ocorra a uma taxa significativa. A aplicação subsequente do mesmo pesticida, resulta em uma degradação rápida e imediata com pequeno ou nenhum período de adaptação (ALEXANDER,1994). Este fenômeno pode ser usado para explicar os mecanismos de adaptação dos microrganismos de solo, na degradação de muitos produtos.

Vários autores tem demonstrado, que a adaptação dos microrganismos pode desempenhar um papel importante na degradação de pesticidas. A adaptação pode ser consequência da transferência gênica ou mutação, indução enzimática, troca populacional ou seleção de microrganismos resistentes. Cada um destes mecanismos contribui para mudanças nas taxas de degradação, observadas após a exposição da comunidade microbiana à um pesticida. Os efeitos da adaptação podem ser dramáticos e, em alguns casos, a taxa de degradação pode ser de até 1000 vezes superior, em solos cujas populações foram previamente expostas ao produto (AHARONSON *et al.*, 1990; KAUFMAN *et al.*, 1985)

A medida que ocorre a multiplicação dos microrganismos, a taxa de degradação aumenta na proporção de seu número. A multiplicação diminui e finalmente cessa devido ao desaparecimento do suprimento alimentar pelo pesticida e, consequentemente, a velocidade de degradação diminui proporcionalmente com a concentração do pesticida, de acordo com a cinética de primeira ordem. Devido ao caráter aproximadamente linear da porção inicial de uma curva de cinética de primeira ordem, um composto que degrada facilmente terá, num gráfico de concentração x tempo, a primeira porção da curva aproximadamente linear. Este tipo de decomposição pode ser observado na Figura 6, o qual resume os resultados deste trabalho para a biodegradação de carbendazim.

De acordo com os resultados obtidos, *A. alternata* após um período de exposição ao carbendazim provavelmente expressou o complemento enzimático necessário para o metabolismo do fungicida. Eles apresentaram um crescimento vantajoso na presença do pesticida, proliferando rapidamente. A condição de "enriquecimento" e a rápida degradação do produto foi caracterizada, neste experimento, pela falta do "período lag", o que indica que o fungo estava adaptado e acelerou a degradação. A rápida biodegradação de pesticidas pode ocorrer devido a um crescimento seletivo de microrganismo degradador quando um pesticida é usado por este microrganismo como fonte de carbono e energia para o crescimento. KAUFMAN *et al.* (1985) revisando o fenômeno da degradação acelerada, postularam que a rápida degradação do pesticida está relacionada à exposição prévia do microrganismo ao pesticida, ou a compostos estruturalmente relacionados, através de aplicações sucessivas do mesmo pesticida. Isto resulta em enriquecimento do solo com microrganismos capazes de sua degradação. Este fenômeno tem sido demonstrado para

vários pesticidas, entre eles o carbendazim (YARDEN *et al.*, 1987; YARDEN *et al.*, 1990; GUPTA & SHARMA, 1989). Entretanto, apesar deste trabalho demonstrar a degradação acelerada de MBC por *A. alternata*, YARDEN *et al.* (1990) evidenciaram que as bactérias tinham um papel preponderante na degradação acelerada de carbendazim quando comparada a *A. alternata*. Segundo os autores, a degradação acelerada pode envolver modificações quantitativas e qualitativas na atividade específica da espécie microbiana e no concomitante processo de degradação do pesticida no solo.

YARDEN *et al.* (1985) atribuíram o desaparecimento de carbendazim em placas inoculadas com *A. alternata* ao metabolismo pelo fungo. Em trabalhos mais recentes YARDEN *et al.* (1990) observaram um aumento na atividade esterolítica nas frações microssomais de *A. alternata* que haviam crescido na presença de MBC, estabelecendo assim o mecanismo metabólico pelo qual *A. alternata* degrada MBC. Os autores, no entanto, sugerem que este mecanismo não rejeita a possibilidade de uma rota alternativa de degradação (induzida ou constitutiva) que poderia estar ativa na cultura fúngica. Ao lado da reação esterolítica, conjugação ou detoxificação oxidativa poderiam ser consideradas como processos igualmente presentes na degradação de carbendazim (ZBOZINEK, 1984; YARDEN *et al.*, 1990).

Apesar de não haver nenhum relato sobre a taxa de degradação adequada para um determinado pesticida, e muito menos para um grupo de pesticidas, o uso de constantes de primeira ordem tem validade na descrição da degradação de um pesticida e, consequentemente, a utilização de modelos de degradação são ferramentas úteis para descrever aproximadamente a degradação de um pesticida. A equação de primeira ordem é a mais comumente usada devido a sua simplicidade de uso. Ela possibilita estimar a meia vida que é o tempo necessário para que haja dissipação de 50% do pesticida, independente da concentração inicial do solo. Neste trabalho foi ajustado um modelo segmentado, o qual permitiu concluir que nas condições experimentais apresentadas, a meia vida de MBC foi de 0,85 dias ou seja 20 horas.

Os relatos na literatura sobre a persistência de benomil e carbendazim são bastante contraditórios, e dependem do substrato, condições experimentais e ambientais. Estudos do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos indicaram que a meia vida do

benomil é de nove horas (USDA-IS, 1987; citado por JOHNSON & LAVY, 1994), enquanto outros trabalhos registraram a meia vida de 6 a 12 meses para o fungicida (RAJAGOPAL *et al.*, 1984b). AUSTIN & BRIGGS (1976), em estudos de campo, observaram que a perda de 50% da dose inicial de carbendazim variou de 26 meses em pH 5,5 a menos que três meses em pH 7,2, indicando que a persistência de carbendazim é dependente de pH. Por outro lado, em culturas bacterianas de solos não tratados previamente com MBC, a meia vida do fungicida foi de 21 dias, enquanto que em culturas bacterianas de solos tratados previamente com MBC, a meia vida foi de 3 a 5 dias (YARDEN *et al.*, 1990), demonstrando assim a degradação acelerada do pesticida na presença de microrganismos adaptados ao fungicida. LIU & HSIANG (1994) determinaram "in vitro" a meia vida de carbendazim ao redor de 4 dias, corroborando o fato de que a meia vida do carbendazim está na dependência do microrganismo, substrato, condições ambientais, pH, além da exposição prévia do microrganismo ao pesticida ou a compostos estruturalmente relacionados.

Outrossim, não foi observado a presença do metabólito 2-amino-benzimidazol, o que provavelmente se deve a rápida mineralização do produto. Segundo AHARONSON *et al.* (1990), as aplicações repetidas de um mesmo pesticida pode também acelerar a degradação dos produtos formados. Eles exemplificam este fato, relatando que o 2-amino-benzimidazol foi rapidamente dissipado em solos que foram expostos a carbendazim e afirmam que a degradação de 2-amino-benzimidazol foi mais rápida que a do seu parental MBC. Este relato permite sugerir que neste trabalho a não detecção de resíduos de 2-amino-benzimidazol em culturas de *A. alternata*, pode ser devido a rápida mineralização, porém são necessários estudos posteriores com compostos radiomarcados para confirmar esta hipótese.

5.4. ESTIMATIVA DA BIOMASSA DE *A. ALTERNATA.*

O crescimento de *A. alternata* em meio de cultura líquido suplementado com carbendazim (Figura 7), foi superior nos dois primeiros dias de incubação, em relação

ao meio de cultura sem carbendazim, coincidindo com o período de maior degradação do pesticida. No período do terceiro ao sétimo dia houve uma leve inibição, verificando-se que a produção de biomassa no sétimo dia foi significativamente inferior em relação ao meio de cultura sem carbendazim. Esta inibição significativa não afetou a velocidade de degradação do pesticida.

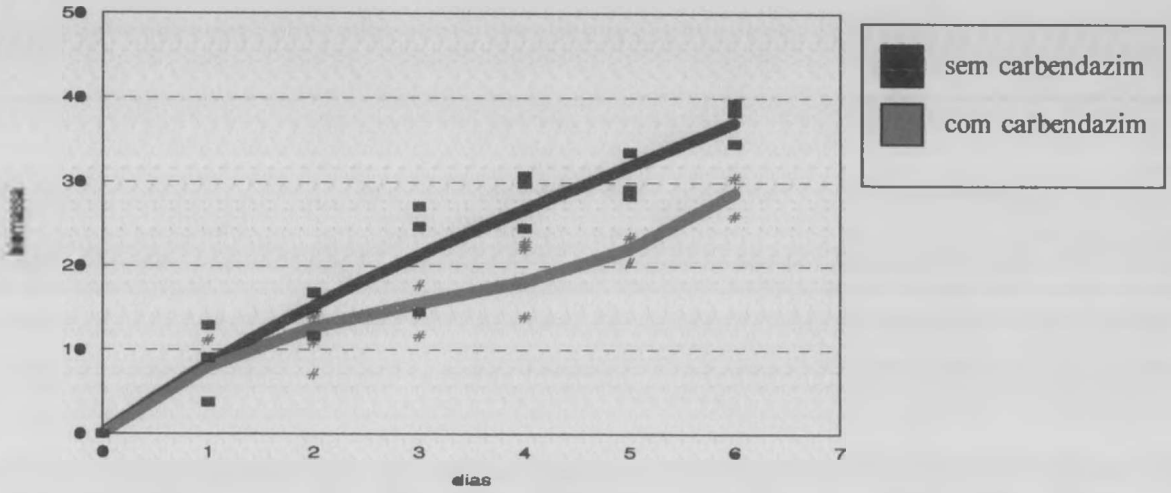


Figura 7. Crescimento de ***Alternaria alternata*** em meio de cultura BD (50%) suplementado ou não com carbendazim (100μg/ml)

Desde o início do uso de pesticidas na agricultura houve uma grande preocupação sobre o efeito detrimental dos pesticidas na microflora do solo. Durante a década de setenta, o desenvolvimento de métodos para estimar o tamanho da biomassa microbiana, forneceu novos caminhos para medir o efeito dos pesticidas na microflora do solo. A aplicação de pesticidas quase sempre reduz a biomassa microbiana além de alterar a estrutura populacional da comunidade microbiana do solo. Pode-se estimar a biomassa microbiana através de estudos "in vitro" pela transferência dos microrganismos para meios de cultura providos de fonte de C, N, P e fatores de crescimento, temperatura e pH adequados à essa população microbiana, para que ela possa consumir os substratos e a se reproduzir, aumentando assim com o tempo a sua concentração, isto é, o número de células por unidade de volume do meio de cultura.

A velocidade específica do crescimento celular é uma característica da população microbiana e seu valor, durante a fase exponencial de crescimento, varia segundo o microrganismo que está sendo cultivado e as condições ambientais de cultivo. A medida que o crescimento evolui, os substratos são consumidos e os metabólitos se acumulam no meio de cultura. Há um determinado instante do processo em que se verifica a limitação de algum nutriente no meio de cultura ou o acúmulo de algum metabólito inibidor a uma concentração deletéria para o crescimento celular. Neste instante, a população microbiana cessa de crescer a uma razão exponencial e os microrganismos apresentam velocidade específica de crescimento decrescente com o tempo na fase de desaceleração e, igual a zero na fase estacionária (URENHA *et al.*, 1994).

Dentre os componentes do meio de cultura, os que provavelmente exercem maior nível de influência na produtividade e na população máxima do processo, são os tipos e as concentrações das fontes de carbono e nitrogênio orgânico. A influência do fungicida MBC como fonte de carbono para o crescimento de *A. alternata* pode ser observado pelos resultados obtidos em meio de cultura com suplementação e sem suplementação de carbendazim (Figura 7). Verificou-se que o efeito do fungicida carbendazim na performance microbiana foi pequeno. No meio de cultura sem suplementação com MBC, o crescimento foi linear (taxa de crescimento constante = 33,82g por dia), enquanto no meio suplementado houve um crescimento acelerado até o terceiro dia onde ocorreu a fase estacionária, voltando a ter um crescimento acelerado a partir do quinto dia, provavelmente devido a influência dos microrganismos mortos. No primeiro caso, foi ajustada uma regressão linear para estimar a taxa de crescimento:

$$Y = 8{,}92\ T$$

e no segundo caso foi ajustado uma regressão polinomial do terceiro grau:

$$Y = 10{,}02\ T - 2{,}38\ T^2 + 0{,}25\ T^3$$

$$^{*}(2{,}07) \quad ^{*}(1{,}00) \quad ^{*}(0{,}12)$$

* erro padrão dos coeficientes

A partir desta curva foi estimado o tempo em torno do qual ocorreu a fase estacionária que corresponde ao ponto de inflexão da curva, que no presente caso foi de três dias. Este ponto delimita a fase de desaceleração e a fase de aceleração do crescimento.

5.5. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (ccd)

A identificação dos resíduos de carbendazim também foi realizada através de cromatografia em camada delgada. Os valores de Rf encontrados para cada metabólito estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Distância média (Rf) percorrida na placa de cromatografia em camada delgada pelo carbendazim e seus produtos de degradação.

	PADRÕES		METABÓLITOS	
	MBC	2-AB	1	2
Rf	0,53	0,29	0,28	0,14

Através dos resultados obtidos, observa-se que houve degradação do carbendazim, dando origem a seus dois metabólitos, com os seguintes Rf 0,28 e 0,14 respectivamente. O metabólito 1 foi identificado como 2-amino-benzimidazol cujo Rf=0,29, indicando a degradação do composto parental por *Alternaria alternata*. De acordo com a rota de degradação proposta por RAJAGOPAL *et al.* (1984b), o carbendazim sofre transformação para 2-amino-benzimidazol e 5-hidroxicarbendazim. O 2-amino-benzimidazol por sua vez transforma-se em CO_2 e 2-AB nucleotídeo. Pelos dados obtidos, *A. alternata* degradou o carbendazim dando origem a dois metabólitos, sendo que um deles foi identificado como 2-amino-benzimidazol, e o outro pode ser o 2-AB nucleotídeo ou 5-hidroxicarbendazim, porém é necessário estudos posteriores utilizando padrões destes metabólitos como referência para que se possa identificá-los.

A técnica de cromatografia em camada delgada pode ser utilizada como um método simples para separar o carbendazim de seus metabólitos.

5.6. REQUISITOS NUTRICIONAIS

5.6.1. Seleção de meios de cultura para crescimento e esporulação.

O gênero *Alternaria* apresenta um crescimento micelial lento e esporulação reduzida nos meios de cultura convencionais e, isso, têm dificultado a produção de inóculo em grande escala, principalmente para propósitos de inoculação em plantas. Várias espécies de *Alternaria* são fitopatogênicas. Nesse sentido é que objetivou-se neste trabalho, desenvolver um meio de cultura ideal para crescimento e esporulação da espécie *A. alternata*.

O crescimento e a esporulação de *A. alternata* foram estudados em diferentes meios de cultura e fotoperíodos. A natureza da curva de crescimento micelial foi avaliada graficamente e verificou-se crescimento linear no período observado. Calculou-se então as taxas de crescimento médio (cm/dia) no período para cada unidade experimental. Foi realizada análise de variância da taxa de crescimento e teste de Duncan para comparação de médias. Os dados de crescimento obtidos em relação aos diferentes meios de cultura (Tabela 4), através da comparação de médias, demonstraram que a linhagem de *A. alternata* em estudo, apresentou melhor desenvolvimento micelial diário no meio de cultura suco V-8, ágar-malte, Sabouraud, aveia-ágar e MC, diferindo significativamente ($P > 0,05$) de BDA e Czapeck. A menor média de crescimento foi obtida no meio de cultura Czapeck, sugerindo que estes organismos são exigentes em algum fator que está presente em alguns meios de cultura.

A análise do efeito dos meios de cultura na esporulação foi realizada considerando-se que o número de conídios, nos oito quadrantes observados, tem distribuição de Poisson. A comparação do número de conídios entre os tratamentos , foi efetuada através do qui-quadrado de Wald. Nos meios de cultura Sabouraud, ágar-malte, BDA e MC não houve esporulação. Observou-se que o isolado de *A. alternata* em meio de cultura suco V-8 esporulou satisfatoriamente, diferindo significativamente ($P> 0,05$) dos demais (Tabela 4).

Tabela 4. Taxa de crescimento micelial e esporulação de *Alternaria alternata* em diferentes meios de cultura. Média de cinco repetições.

Meio de cultura	Taxa crescimento micelial		Esporulação (x 10^4 conídios/ml)***
	cm/dia*	∅ colônia**	
Suco V-8	1,02a	8,3a	0,5a
Ágar-malte	0,99a	8,2ab	0,0
Sabouraud	0,90ab	8,0ab	0,0
Aveia-ágar	0,90ab	7,7ab	0,23a
MC Pontecorvo	0,82abc	7,6ab	0,0
BDA	0,76c	6,6bc	0,0
Czapeck	0,61c	5,2c	0,03b

* Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.
** Médias (cm) tomadas aos oito dias de incubação
*** Médias seguidas da mesma letra , na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste qui-quadrado de Wald.

A influência do fotoperíodo no crescimento e esporulação de *A. alternata* em meio suco V-8 pode ser observada na Tabela 5. Analisou-se a natureza da curva do crescimento micelial (diâmetro x tempo) verificando-se um comportamento linear no período observado. Foram então calculadas as taxas de crescimento micelial para cada unidade experimental. Realizou-se análise de variância das taxas de crescimento e teste de Duncan para comparação de médias. Houve um desenvolvimento micelial significativo ($P>0,05$), para todos os regimes de luz testados.

Tabela 5. Taxa de crescimento micelial e produção média de esporos de *Alternaria alternata* em meio suco V-8 sob diferentes regimes de luz. Média de cinco repetições.

Fotoperíodo	Taxa de crescimento micelial		Esporulação (x 10^4 conídios/ml)***
	cm/dia*	∅ colônia**	
Escuro	1,03a	7,6a	0,70a
12h luz UV/12h esc.	1,00a	8,5a	0,32b
Luz contínua (flúor.)	0,90b	8,6a	0,0
12h luz flúor/12h esc	0,88b	5,2b	0,07c

* Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade
** Médias (cm) tomadas aos seis dias de incubação.
*** Médias seguidas da mesma letra , na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste qui-quadrado de Wald.

A análise estatística sobre a produção de conídios, em diferentes fotoperíodos, seguiu a mesma metodologia anteriormente apresentada sobre a influência

dos diferentes meios de cultura na esporulação de *A. alternata*. Neste caso a esporulação mostrou-se diferenciada de acordo com o fotoperíodo. Ela foi maior quando *A. alternata* foi incubado nas condições de escuro e no fotoperíodo de 12 horas de luz próxima ao ultra-violeta, diferindo dos demais tratamentos. Nos demais fotoperíodos houve um decréscimo na esporulação indicando que houve influência da luz na produção de conídios.

Uma característica comum a todas as espécies de *Alternaria* é a baixa capacidade ou mesmo ausência de esporulação em meio de cultura. Um grande número de trabalhos indicam diferentes métodos de indução da esporulação. MISAGHI *et al.* (1978) consideraram desnecessária a alternância de luz e escuro na esporulação de *A. alternata* e UNGARO & AZEVEDO (1985) obtiveram esporulação abundante nas colônias mantidas no escuro. Segundo estes autores, a ausência de luz favoreceu o crescimento e a esporulação, no entanto, em temperaturas mais baixas, a luz pode ser necessária, como observado por ARAGAKI, 1964; PRASAD *et al.*, 1973). Eles afirmam que nas colônias mantidas a temperaturas inferiores a 24° C, a presença de luz favoreceu a esporulação e o crescimento. Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, onde a esporulação foi favorecida pela ausência de luz, sob temperatura ambiente a 28°C ± 1°C.

Outrossim, vários meios de cultura também têm sido utilizados para melhorar a esporulação e crescimento das espécies de *Alternaria*. O meio mais comum é o batata-dextrose-ágar (BDA). No entanto, observa-se que meios como suco V-8 ou adição de extrato de folhas de girassol (UNGARO & AZEVEDO, 1985), apesar de não alterarem o crescimento, favoreceram a esporulação. Os dados deste trabalho são coincidentes com este relato quanto ao aumento significativo da esporulação no meio de cultura suco V-8, indicando neste meio a presença de algum fator que induziu a produção de conídios.

5.6.2. **Influência das fontes de carbono, nitrogênio e vitaminas.**

O efeito das diferentes fontes de carbono sobre o crescimento e esporulação de *A. alternata* pode ser observado na Tabela 6. O meio sintético básico suplementado com biotina, NH_4Cl e os carboidratos glicose e maltose, suportaram um bom crescimento micelial de *A. alternata* (em média 0,75cm/dia). Outros substratos como galactose e

arabinose produziram pequenas quantidades de micélio, enquanto as fontes de carbono restantes (Tabela 6) apresentaram taxas de crescimento semelhantes, indicando que não houve efeito significativo na utilização dos substratos pela linhagem fúngica. A produção de conídios apresentou comportamento diferenciado dependendo do substrato (Tabela 6). Na presença de galactose (0,50 X 10^{-4} conídios/ml) e arabinose (0,41X 10^{-4} conídios/ml) observou-se maior número de conídios, enquanto na presença de sacarose não houve desenvolvimento dos mesmos. Porém, mesmo assim, não houve evidências de um efeito significativo (P = 0,06) entre as fontes de carbono.

Tabela 6: Avaliação do crescimento micelial e esporulação de *Alternaria alternata* em meio sintético básico com diferentes fontes de carbono. Média de seis repetições.

Fonte de carbono	Taxa de crescimento micelial		esporulação (x10^4 conídios/ml)
	cm/dia*	∅ colônia**	
D- arabinose	0,46a	5,1	0,41
D- galactose	0,60b	6,6	0,50
D- frutose	0,71c	7,8	0,30
Xilose	0,71c	7,9	0,16
Inositol	0,73c	8,0	0,19
Manitol	0,73c	8,0	0,16
Celobiose	0,73c	8,0	0,03
D-glucose	0,74c	8,1	0,25
Sacarose	0,75c	8,3	----
Sorbitol	0,76c	8,4	0,06
D- maltose	0,77c	8,4	0,06

* Médias seguidas da mesma letra , na mesma coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tuckey ao nível de 5% de probabilidade (CV=4,53%)

** Médias (cm) tomadas aos onze dias de incubação.

O efeito das vitaminas nas culturas semeadas em meio sintético básico + glicose + NH_4Cl (Tabela 7), demonstrou um crescimento micelial semelhante para as vitaminas biotina e piridoxina. A tiamina apresentou um crescimento reduzido diferindo significativamente das demais, no entanto, a esporulação mostrou-se diferenciada (Tabela 7), sendo que a adição de tiamina favoreceu a produção de conídios (0,13 X 10^{-4} conídios/ml). Não houve evidências significativas do efeito das diferentes vitaminas na esporulação

Tabela 7: Avaliação do crescimento micelial e esporulação de *Alternaria alternata* em meio sintético básico suplementado com diferentes vitaminas. Média de seis repetições.

Fonte de Vitamina	Taxa de crescimento micelial		Esporulação ($x10^4$ conídios/ml)
	cm/dia*	Ø colônia**	
Biotina	0,72a	6,3	0,05
Piridoxina	0,70a	6,3	0,05
Tiamina	0,55b	5,9	0,13

* Medias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem pelo Teste de Tuckey a nível de 5% de probabilidade (DMS = 0,134 e CV= 12,09%)
** Médias (cm) tomadas aos oito dias de crescimento

Nos meios de cultura sintéticos suplementados com glicose e biotina, a adição de nitrato de potássio suportou bom crescimento micelial (0,72 cm/dia), enquanto a adição de cloreto de amônia e glutamina apresentou menor crescimento (Tabela 8). Comparando as diferentes fontes de nitrogênio, não observou-se diferenças na produção de conídios entre KNO_3 e NH_4Cl. Em presença de glutamina não houve esporulação.

Tabela 8: Avaliação do crescimento micelial (cm) e esporulação de *Alternaria alternata* em meio sintético básico com diferentes fontes de nitrogênio. Média de seis repetições.

Fonte de Nitrogênio	Taxa de crescimento micelial		
	cm/dia*	Ø colônia**	Esporulação ($x10^4$ conídios/ml)
KNO_3	0,72a	6,2	0,03
Glutamina	0,63b	6,2	-------
NH_4Cl	0,60b	4,9	0,03

* Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente pelo Teste de Tuckey ao nível de 5% de probabilidade (DMS=0,07 e CV=5,98%)
** Médias (cm) tomadas aos oito dias de crescimento

Estes resultados levam a conclusão que a fonte de carbono e nitrogênio foram os fatores que mais influenciaram o crescimento, sendo que a fonte de carbono foi essencial para a produção de conídios.

A composição do meio de cultura é fundamental no crescimento dos microrganismos. Seu correto balanceamento, em termos de fonte de carbono, nitrogênio, fósforo e componentes menores como vitaminas e cofatores, é fator decisivo para o crescimento e esporulação de *A. alternata*. Dentre os componentes do meio de cultura, os

que provavelmente exercem maior nível de influência na produtividade e população máxima do processo são o tipo e a concentração de fontes de carbono e nitrogênio (URENHA,*et al.*, 1994).

Somente poucos mono e dissacarídeos, em combinação com KNO_3 como fonte de N foram utilizados por *A. alternata.* A adição de vitaminas foi essencial para o desenvolvimento desta linhagem fúngica. As vitaminas são dispensáveis no desenvolvimento de fungos filamentosos, porém são indispensáveis para os micoparasitas biotróficos e destrutivos, como por exemplo *Sporidesmium sclerotivorum* (FRIES, 1965; BARNETT, 1970; BARNETT & AYRES, 1981). Outros micoparasitas crescem, rapidamente em meio sintético sem vitaminas, ex. *Trichoderma* spp (ELAD *et al.*, 1981). VAN DEN BOOGERT (1989) observou que *Verticillium biguttatum* cresceu axênicamente em meio líquido sintético com um composto contendo grupo amino como fonte de nitrogênio, glicose como fonte de carbono e biotina como fator de crescimento. A linhagem de *A. alternata,* em estudo, cresceu profusamente (1,28 cm/dia) em meio sintético básico contendo maltose + vitaminas (biotina ou piridoxina) + KNO_3. A peptona, associada ao meio citado acima teve efeito negativo no crescimento radial das colônias (0,86 cm/dia). Nas fontes restantes de carbono foi observado o mesmo efeito sobre o crescimento pelo acréscimo de peptona ao meio.

Muitos microrganismos, não exigentes, tais como as *Pseudomonas*, podem crescer em meios de cultura com a composição sintética simples, porém numerosos microrganismos necessitam também de um ou mais micronutrientes, vitaminas ou outros produtos. É desejável encontrar para cada microrganismo a necessidade mínima de nutrição e, desenvolver um meio mínimo que contenha somente os compostos realmente necessários para o crescimento

5.7. **CARACTERIZAÇÃO CITOLÓGICA.**

A linhagem de *A. alternata* caracterizada citologicamente apresentou conidióforos e conídios âmbar. Os conídios apresentaram-se em longas e ramificadas cadeias e possuem formato ovóide com comprimento variando de 15,4 a 38,4 μm e

diâmetro de 5,8 a 9,0 μm com 1 a 5 septos transversais (Figura 8). O número médio de núcleos por conídio é igual a 4 (Figura 9).

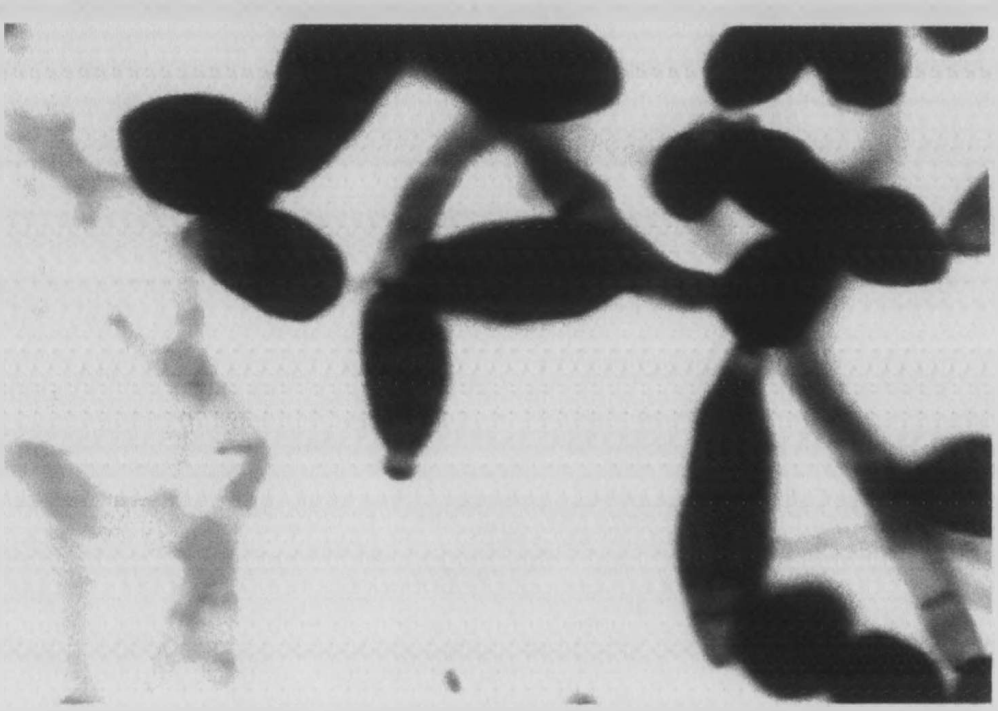


Figura 8. Conídios da linhagem de *A. alternata* degradadora de carbendazim. Detalhe dos septos. (Objetica 100x)

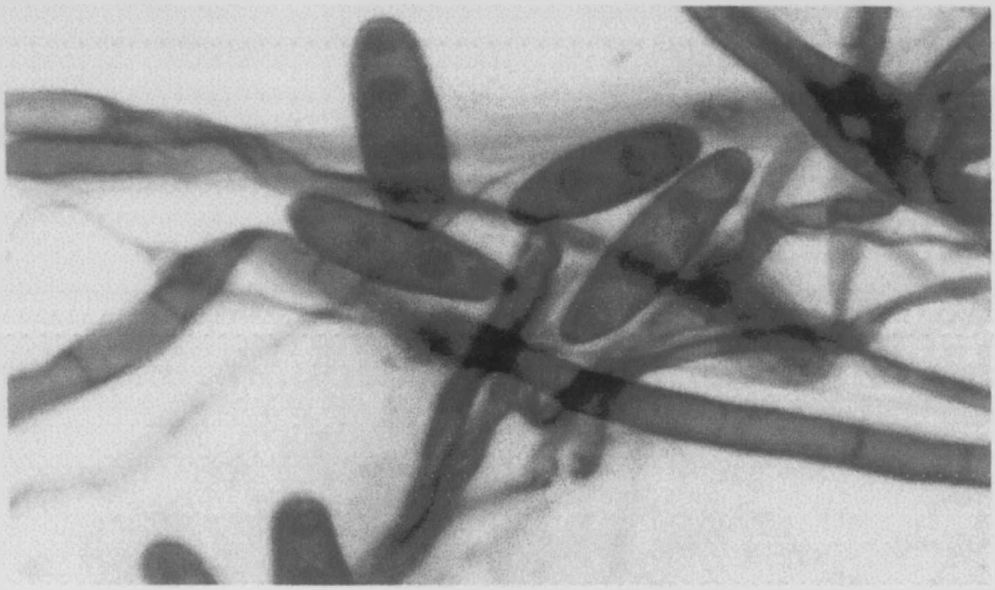


Figura 9. Conídios de linhagem de *Alternaria alternata* degradadora de carbendazim. Detalhe dos núcleos. Objetiva 100x.

As Figuras 10 e 11, apresentam os histogramas com as distribuições de freqüência relativas ao comprimento e largura dos conídios, tamanho do núcleo e número de núcleos por conídio.

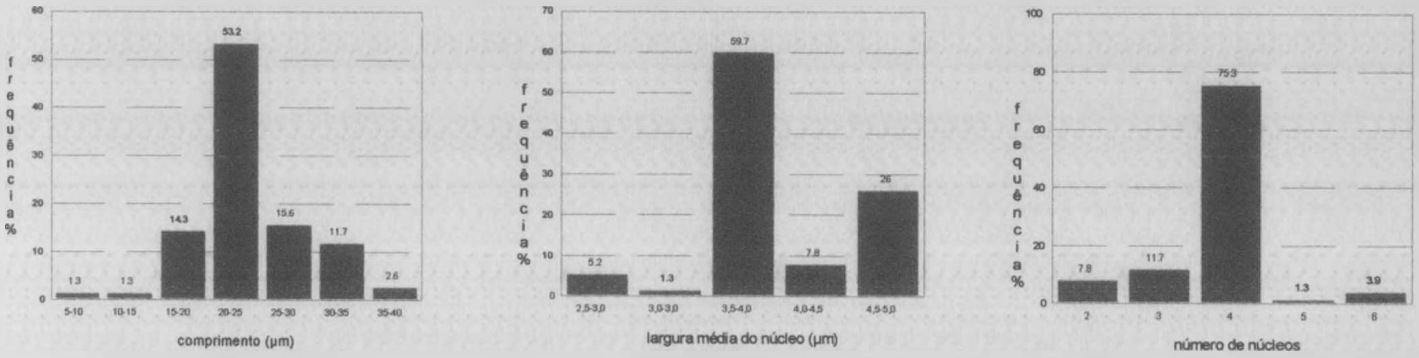


Figura 10. Histograma da distribuição de freqüência relativa do comprimento e largura do conídio, e distribuição de núcleos por conídio.

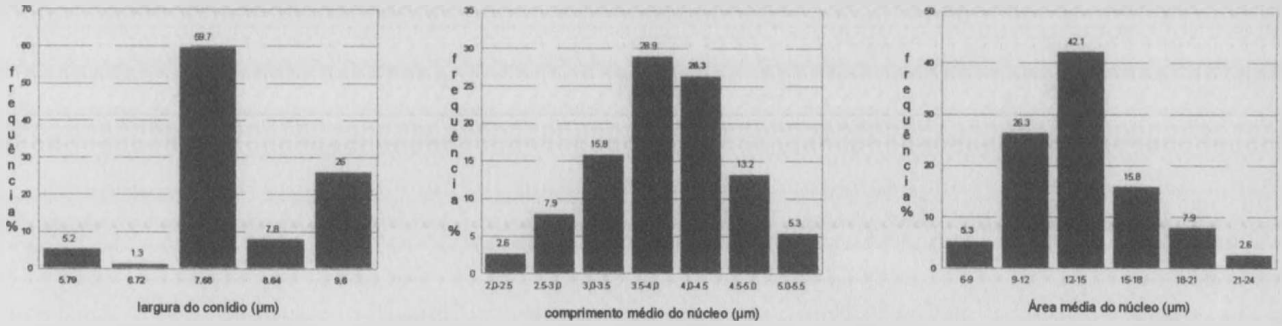


Figura 11. Histrograma da distribuição de freqüência relativa da largura, comprimento e área do núcleo.

Os membros do gênero *Alternaria* formam um grupo de fungos que podem estar associados com plantas, como saprófitas ou como parasitas. A espécie *A. alternata* é descrita por SIMMONS (1967) como possuindo conidióforos simples, retos ou curvos, lisos, com 1 a 3 septos e com perfuração apical. O conídio é em geral ovóide, septado e usualmente possui um poro basal bastante visível, o que confirma a linhagem isolada como *Alternaria alternata*.

5.8. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

A eletroforese em gel de poliacrilamida, envolvendo a linhagem de *A. alternata* em estudo, (denominada Alt A) e outras duas linhagens fitopatogênicas (CCT 1250 e CCT 3823) foi realizada para os padrões de esterases e proteínas totais.

A ocorrência de bandas eletroforéticas nos sistemas izoenzimáticos das esterases α e β para as três linhagens de *A. alternata*, está representada pela Figura 12. Os modelos obtidos para este sistema diferiram no número de bandas e na mobilidade entre as mesmas, para as diferentes linhagens. Foi possível distinguir oito bandas, sendo que a banda α esterase com Rm = 0,58 foi comum às três linhagens, diferindo somente na mobilidade para a linhagem CCT 1250. As bandas com Rm = 0,65 e 0,67 da β esterase foram comuns às linhagens Alt A e CCT 3823. As bandas α esterase com Rm = 0,54 e 0,52 e as bandas β esterase com Rm = 0,72 e 0,76 foram detectadas somente na linhagem Alt A. Estes resultados mostram que, a variabilidade detectada no sistema esterase de *A. alternata* permite seu uso para a caracterização destas linhagens. A caracterização foi complementada com a inclusão dos padrões eletroforéticos para proteínas totais.

A análise do padrão protéico das amostras de *A. alternata* incubadas por diferentes períodos (1 a 6 dias) e em três concentrações do fungicida carbendazim (0; 10 e 100 μg/ml) apresentaram variação, tanto para o padrão como para as bandas.

A Figura 13 mostra os resultados obtidos das diferentes proteínas expressas quando as linhagens fúngicas em estudo foram cultivadas em meio de cultura BD com e sem carbendazim. Não houve variação para o padrão nem para as bandas quando a linhagem Alt A de *A. alternata* foi incubada em meio de cultura sem carbendazim. No entanto, pode-se verificar pela análise das bandas protéicas que o padrão das bandas nas amostras que cresceram na presença do fungicida são muito semelhantes, apesar da intensidade da expressão ser diferente. As exceções encontradas foram para as bandas com Rm = 0,65 e 0,83. No primeiro caso, verificou-se a presença desta banda somente quando o fungo foi cultivado por dois dias na concentração de 10μg/ml de carbendazim. As bandas com Rm = 0,83 foram observadas somente quando da concentração de 100μg/ml de carbendazim, indicando expressão diferenciada das proteínas na presença de altas

concentrações do fungicida. As linhagens CCT 1250 e CCT 3823, incubadas em meio de cultura BD sem carbendazim, apesar de apresentarem bandas em comum, têm algumas proteínas que são expressadas somente em uma das linhagens. Estes resultados corroboram com os do perfil esterático, no tocante a variabilidade das linhagens.

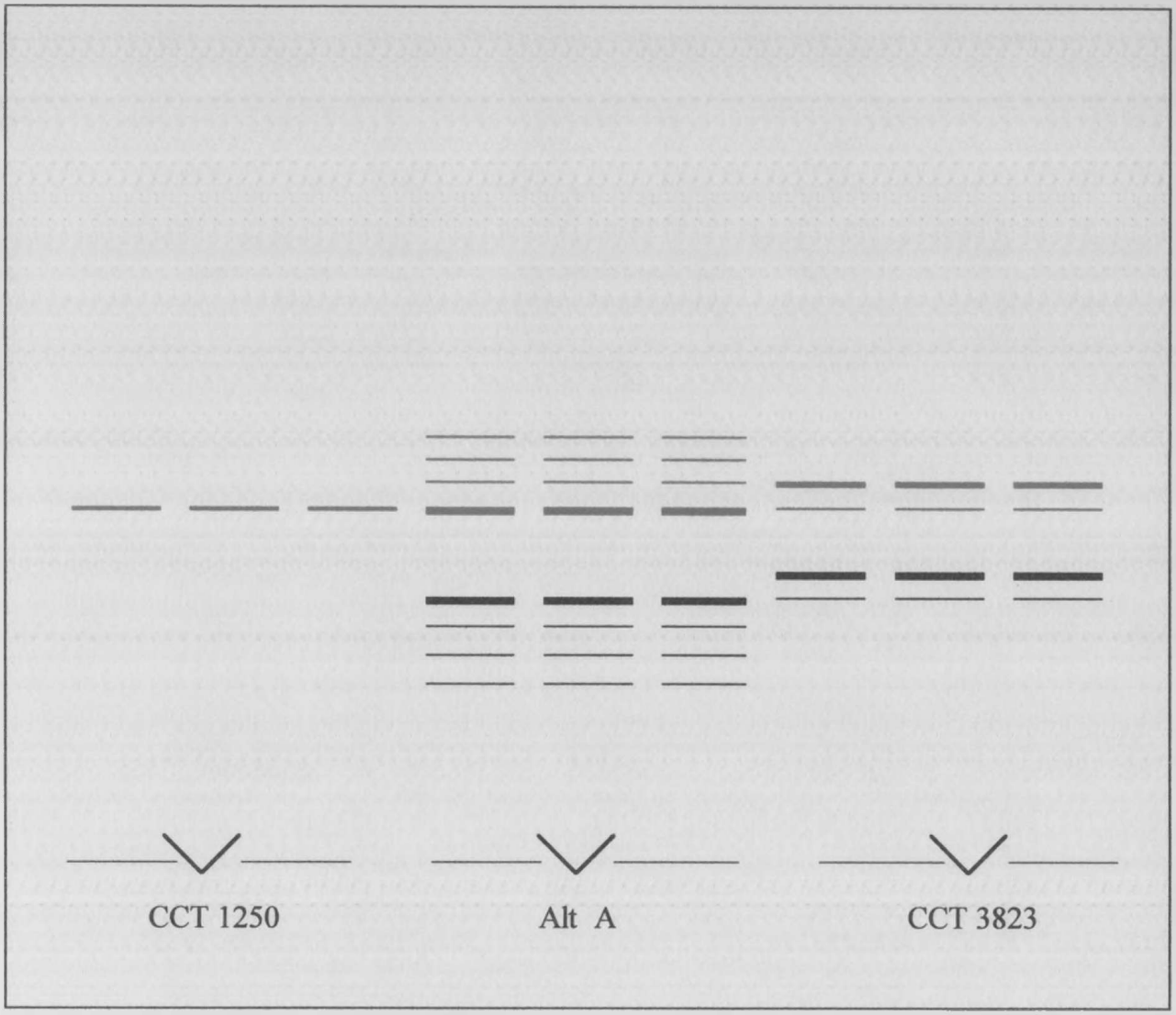


Figura 12. Zimograma dos padrões eletroforéticos nos sistemas alfa e beta - esterases em três linhagens de *Alternaria alternata*.

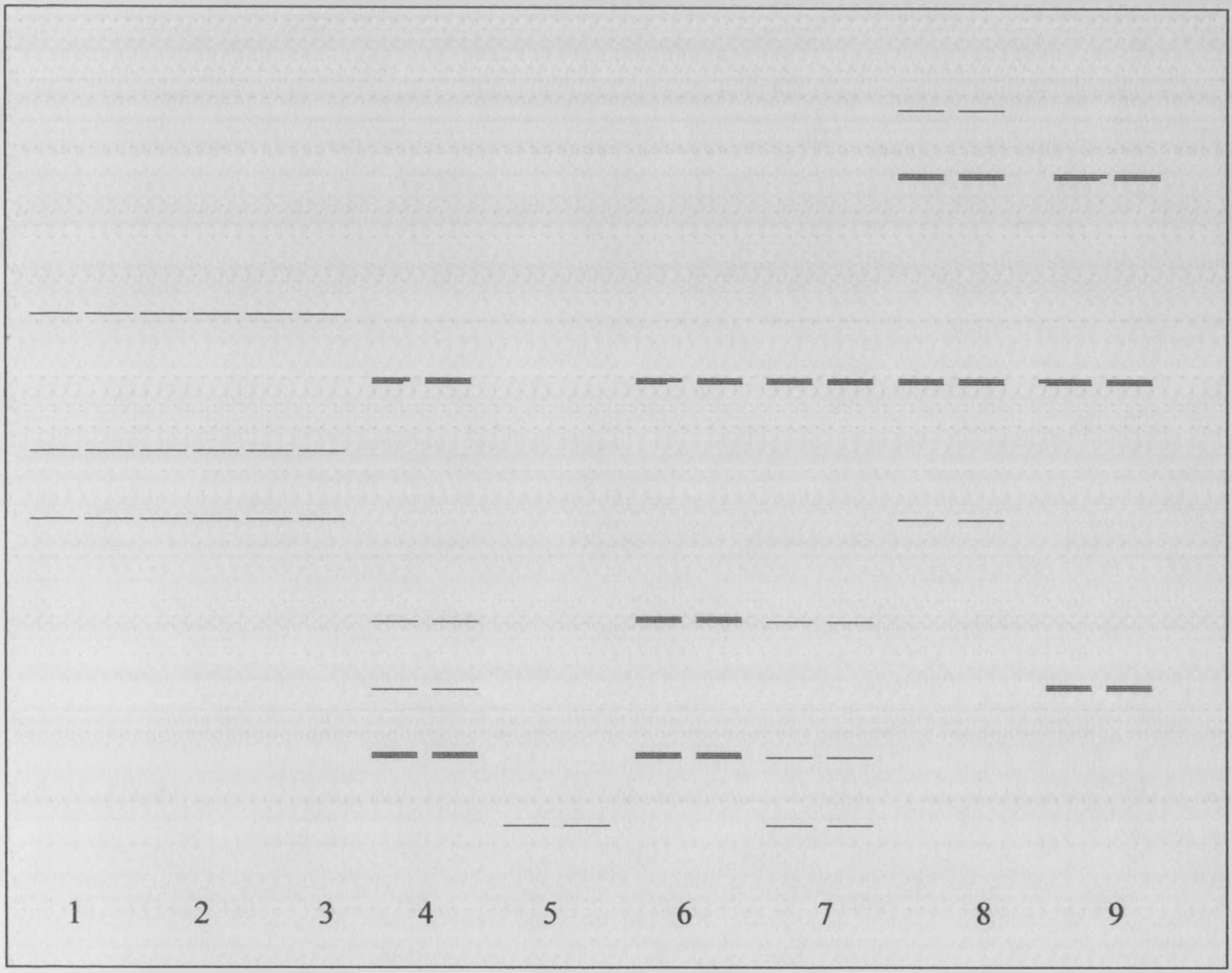


Figura 13. Zimograma da expressão protéica em três diferentes linhagens de *Alternaria alternata* incubadas em meio de cultura (batata-dextrose -BD) com e sem carbendazim (MBC). 1) 2 dias ; 2) 4 dias ; 3) 6 dias ; 4) 2 dias (MBC 10μg/ml; 5) 2 dias (MBC 100μg/ml); 6) 4 dias (MBC 10μg/ml); 7) 6 dias (MBC 100μg/ml); 8) CCT 1250; 9) CCT 3823.

Os modelos eletroforéticos de enzimas solúveis e outras proteínas de fungos, representam uma manifestação direta da constituição genética celular e, podem ser bastante úteis quando utilizadas para classificação taxonômica destes organismos. Estes modelos exibem uma menor variação dentro da espécie do que entre espécies, mas são muito úteis para a caracterização dos isolados dentro da espécie (CONTI *et al.*, 1980). A possibilidade da caracterização eletroforética de diferentes linhagens é importante para auxiliar algumas

técnicas, como por exemplo a de degradação, como neste caso, uma vez que alguns isolados podem exibir diferentes graus de patogenicidade.

Alguns autores tem correlacionado diferenças nos perfis enzimáticos com alterações do material genético ocorrido por mutações, responsáveis pelos padrões com diferentes posições de migrações em linhagens selvagens e mutantes (PACCOLA-MEIRELES, 1988; VALADARES, 1989; FURLANETO, 1989). Sendo assim, pode-se utilizar perfis de esterase para a detecção da variabilidade natural de *Alternaria*, uma vez que este padrão possibilitou a obtenção de bandas visíveis e características nas diferentes linhagens estudadas.

5.9. TESTE DE PATOGENICIDADE DO ISOLADO DE *ALTERNARIA ALTERNATA*

Nas diferentes plantas testadas não foram observadas reações positivas de hipersensibilidade ao fungo em questão, até o sétimo dia de incubação.

Os fungos do gênero *Alternaria* têm sido relatados como agentes causais de diversas doenças na agricultura. Muitos são reconhecidamente patógenos importantes, que podem causar uma variedade de sintomas incluindo manchas nas folhas, requeima das folhas ou danos nas flores, sementes e frutos. Nos últimos quarenta anos, os metabólitos secundários produzidos pelas espécies do gênero *Alternaria* têm despertado interesse devido as suas atividades biológicas.

Alternaria alternata é uma espécie freqüentemente considerada como saprófita ou fraco parasita. PETRUNACK & CHRIST (1992) citam *A. alternata* como causadora de manchas ambar nas folhas e doença nos frutos do tomateiro. Estes fungos também foram isolados como causadores de doenças em pimenta (SHERF & MACNAB, 1986).

A linhagem de *A. alternata* isolada como degradadora de carbendazim não apresentou patogenicidade nos estudos efetuados, porém as variações encontradas entre as espécies de *Alternaria* e mesmo entre as linhagens de *A. alternata* levam a sugerir que sejam efetuados estudos mais detalhados, uma vez que pelos resultados apresentados foi de suma importância a ação seletiva do carbendazim sobre os microrganismos do solo. O

fungo *A. alternata* se mostrou apto a utilizar o carbendazim como fonte de alimento e, portanto, a tendência é que aumente sua população com aplicações sucessivas do fungicida.

6. CONCLUSÕES

1. O método de suplementação do solo com benomil permitiu a seleção de fungos resistentes e degradadores de carbendazim.
2. ***Alternaria alternaria*** utilizou o fungicida carbendazim como fonte de carbono, degradando 66,4% do produto em dois dias, apresentando uma meia vida para carbendazim de aproximadamente 20 horas. A atividade máxima de ***A. alternata*** foi observada no terceiro dia de incubação em meio de cultura BDA com carbendazim.
3. Os meios de cultura suco V-8, ágar-malte, sabouraud, aveia-ágar e MC de Pontecorvo permitiram um crescimento micelial significativo, enquanto que a esporulação foi significativa somente no meio de cultura suco V-8.
4. As fontes de carbono glicose e manose apresentaram um desenvolvimento micelial de ***A. alternata*** satisfatório, enquanto que, arabinose e galactose, como fontes de C, nas mesmas condições experimentais, demonstraram esporulação eficiente.
5. A linhagem Alt A de ***A. alternata*** apresentou diferentes perfis de bandas para o padrão eletroforético α e β esterase, e expressa diferentes proteínas na presença de MBC quando comparada às proteínas produzidas em meio sem MBC.

7. RESUMO

O carbendazim, produto de hidrólise do benomil, é um composto estável, insolúvel em água e um fungicida menos sistêmico que o benomil. A dissipação e a perda da atividade biológica destes fungicidas dependem em grande parte da ação de microrganismos. Com o objetivo de avaliar a população fúngica do solo que age sobre o carbendazim, três diferentes solos, foram tratados com 50μg/g de benomil. Após a incubação, os fungos foram isolados e testados em meio enriquecido com diferentes concentrações de benomil (10, 20, 50 e 100μg/g). Entre os fungos analisados, *Alternaria alternata* apresentou crescimento mais rápido, diferindo significativamente dos demais. Em meio de cultura líquido, enriquecido com 100μg/ml de carbendazim, *A. alternata* degradou rapidamente o fungicida, chegando a 66,4% de consumo do produto em dois dias. Esta linhagem foi caracterizada morfológica, citológica e bioquimicamente. O crescimento e esporulação deste microrganismo foi avaliado em diferentes meios de cultura e fotoperíodos. A partir destes resultados verificou-se um melhor desenvolvimento micelial nos meios de cultura Suco V-8, Ágar-malte, Sabouraud e Aveia- ágar. A esporulação seguiu o mesmo comportamento do crescimento. A esporulação foi mais intensa no escuro, demonstrando assim a influência do fotoperíodo na produção de esporos. *A. alternata* apresenta esporos ovóides com comprimento variando de 15,4 a 38,4μm e diâmetro de 5,8 a 9,0μm, com 1 a 5 septos transversais. A caracterização bioquímica foi efetuada por eletroforese em gel de poliacrilamida entre a linhagem em estudo e outras duas linhagens fitopatogênicas. Os padrões de esterase e proteínas totais demonstraram perfis diferenciados para os isolados em ambos os sistemas.

8. SUMMARY

Carbendazim, a product of benomyl hydrolysis, is a stable compound, insoluble in water and a fungicide with a lower systemic effect compared to benomyl. The dissipation and biological activity loss of these fungicides depends, most of the time, on the microbial degradation. From three different kinds of soil enriched with benomyl (50µg/g) were isolated microorganisms that grew in different concentration of benomyl (10, 20, 50 and 100 µg/g). Among the analysed fungi, ***Alternaria alternata***, in medium enriched with carbendazim (100 µg/ml), showed a faster degradation rate, reaching 66,4% of the product disappearance in two days. The half-life of carbendazim in this study was of 20 hours. The growth and sporulation of ***A. alternata*** were evaluated in different culture media and photoperiods. The best media for those traits were V-8 Juce, Malt-Ágar, Sabouraud medium and Oat-Agar. With relation to the photoperiod, it was concluded that the sporulation was stimulated when the fungus was incubated in the dark. The fungus presents ovoid spores, with length ranging from 15,4 to 38,4µm and width ranging from 5,8 to 9,0µm and presenting from 1 to 5 septs. The electrophoretic patterns for total proteins and for esterase showed that the biodegrading strain presents different polymorphic bands when compared to phytopathogenic strains.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNIHOTRI, V.P. Thiram induced changes in soil microflora, their physiological activity and control of damping - off in chillies (**Capsicum annum**). **Indian Journal of Experimental Biology,** v.72, p. 85-88, 1974.

AHARONSON, N.; KAFKAFI, V. Adsorption, mobility and persistence of thiabendazole and methyl-2-benzimidazolecarbamate in soils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v.23, p.720-724, 1975.

AHARONSON, N.; KATAN, J.; AVIDOV, E.; YARDEN, O. The role of fungi and bacteria in the enhanced degradation of the fungicide carbendazim and the herbicide diphenamid. **In**: RACKE, K.D. e COATS, J.R. eds. **Enhanced biodegradation of pesticides in the environment.** Washington: American Chemical Society, 1990. p.113-127. (ACS Symposium Series, 426).

ALEXANDER, M. Biodegradation of chemicals of environmental concern. **Science**, v.211, p.132-138, 1981.

ALEXANDER, M. Biodegradation and bioremediation. San Diego: Academic press, 1994. 301p.

ARAGAKI, M. Relation of radiation and temperature on the sporulation of *Alternaria tomato* and other fungi. **Phytopathology**, v.54, p. 565-569, 1964.

AUSTIN, D.J.; BRIGGS, G.G. A new extraction method for benomyl residues in soil and its application in movement and persistence studies. **Pesticide Science**, v.7, n.2, p.201-210, 1976.

AZEVEDO, J.L.; COSTA, S.O.P. **Exercícios práticos de genética**. São Paulo: EDUSP, 1973. 288p.

BAILEY, G.W.; SAFIR, G.R. Effect of benomyl on soybean endomycorrhizae. **Phytopathology**, v.68, n.12, p.1810-1812, 1978.

BARNETT, E.A.; AYRES, W.A. Nutritional and environmental factors affecting growth and sporulation of *Sporidesmium sclerotivorum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.27, p. 685-691, 1981.

BARNETT, H.L. Nutritional requirements for axenic growth of some haustorial mycoparasites. **Mycologia**, v.62, p. 750-760, 1970.

BAUDE, F.J.; GARDINER, J.A.; HAN, J.C.Y. Characterization of residues on plants following foliar spray application of benomyl. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.21, n.6, p.1084-1094, 1973.

BAUDE, F.J.; PEASE, H.L.; HOLT, R.F. Fate of benomyl on field soil and turf. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.22, n.3, p.413-418, 1974.

BELANGER, A. Residues of azinphosmethyl, cypermethrin, benomyl and chlorotalonil in monarda and peppermint oil. **Acta Horticulture**, v.249, p.67-73, 1989.

BOATMAN, N; PAGET, D.; HAYMAN, D.S.; MOSSE, B. Efeitos de fungicidas sistêmicos em infecção por micorriza vesicular-arbuscular e captação de fosfato pela planta. **Transaction of the British Mycological Society**, v.70, p.443-448, 1978.

BOLLEN, G.J.; FUCHS, A. On the specificity of the in vitro and in vivo antifungal activity, of benomyl. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v.76, p.299-312, 1970.

BOLLEN, G.J.; SCHOLTEN, G. Acquired resistence to benomyl and some other systemic fungicides in a strain of **Botrytis cinerea** in Cyclamen. **Netherlands Journal of Plant Pathology**,. v.77, p.83-90, 1971.

BRAY, D. **Cell movements**. New York: Garland Publishing, 1992.

CATSKA, V.; VRANY, J., Rhizosphere mycoflora of wheat after foliar application of chorocholin chloride, urea and 4-chloro-2-methyl-phenoxyacetic acid. **Folia Microbiologica**, v.21, p.268-271, 1976.

CHIBA, M.; DOORNBOS, F. Instability of benomyl in various conditions. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.11, p.273-274, 1974.

CLEMONS, G.P.; SISLER, H.D. Formation of a fungitoxic derivative from Benlate. **Phytopathology**, v.59, p.705-706, 1969.

CONTI , E. de; MESSIAS, C.L.; SOUZA, H.M.L.; AZEVEDO, J.L. Eletrophoretic variation in esterases and phosphatases in eleven wild-type strains of *Metarrhizium anisopliae*. **Experientiae**, v.36, p.293-294, 1980.

DAVIDSE, L.C. Benzimidazole compounds: seletivity and resistance. **In**: DEKKER, J.; GEORGOPOULOS, S. G., eds. **Fungicide resistance in crop protection**. Wageningen: Centre for Agricultural Publishing and Documentation, 1982. p.60-70.

DAVIDSE, L.C. Metabolic conversion of methyl benzimidazole-2-yl-carbamate (MBC) in **Aspergillus nidulans. Pesticide Biochemistry and Physiology**,. v.6, p.538-546, 1976.

DAVIDSE, L.C.; FLACH, W. Differential binding of methyl-benzimidazol-2-yl-carbamate to fungal tubulin as a mechanism of resistance to this antimitotic agent in mutant strains of **Aspergillus nidulans. The Journal of Cell Biology**, v.72, p.174-193, 1977.

DE BERTOLDI, M; PICCE, G.; GIOVANNETTI, M. Effetti genotossici ed alterazioni della flora micorrhizica e rizosferica causati da alcuni fungicidi agricoli. **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**, v.27, p.131-135, 1978.

DIOS CANCELA, G.; ROMERO TABOADA, E.; SANCHEZ-RASERO. Carbendazim adsorption on montmorillonite, peat and soil. **Journal of Soil Science**, v.43, n.1, p.99-112, 1992.

EDGINGTON, L.V.; KHEW, K.L.; BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, v.61, n.1, p.42-44, 1971.

ELAD, Y.; CHET, I.; HENIS,Y. A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* spp from soil. **Phytoparasitica**, v.9, p.59-67, 1981.

FARETRA, F.; POLLASTRO, S. Genetics of sexual compatibility and resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in isolates of **Botryotinia fuckeliana (Botrytis cinerea)** from nine countries. **Plant Pathology**, v.42, n.1, p.48-57, 1993.

FERRIS, R.S.; MITCHELL, D.J. Populations dynamics of soil microorganisms associated with fungicide dusted **Caladium** seed pieces. **Soil Biology and Biochemistry**, v.13, p.57-63, 1981.

FLEECKER, J.R.; LACY, H.M.; SCHULTZ, I.R.; HOUKOM, E.C. Persistence and metabolism of thiophanate-methyl in soil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.22, n.4, p.592-595, 1974.

FOSTER, M.G.; McQUEEN, D.J. The effects of single and multiple application of benomyl on non-target soil bacteria. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.17, p.477-485, 1977.

FRIES, N. The chemical environment for fungal growth. 3. Vitamins and other organic growth factors. IN: AINSWORTH, G.C.; SUSSMAN, A.S. eds **The fungi, an advanced treatise**, vol. I. New York: Academic Press, 1965. p. 491-523.

FUCHS, A.; de VRIES F.W. Bacterial breakdown II. Mixed cultures. **Antonie van Leeuwenhoeck. Journal of Microbiology and Serology**, v.44, p.293-309, 1978b.

FUCHS, A.; de VRIES F.W. Bacterial breakdown of benomyl. I-Pure cultures. **Antonie van Leeuwenhoeck. Journal of Microbiology and Serology**, v.44, p.283-292, 1978a.

FUCHS, A.; HOMANS, A.L.; de VRIES, F.W. Systemic activity of benomyl [1-(butylcarbamoyl)-2-benzimidazolecarbamic acid methyl ester] against fusarium wilt of pea and tomato plants. **Phytopathology**, v.69, p. 630-636, 1970.

FUJIMURA, M.; OEDA, K.; INOUE, H.; KATO, T. A single amino-acid substitution in the beta-tubulin gene of **Neurospora** confers both carbendazim resistance and diethofencarb sensitivity. **Current Genetics**, v.21, p.399-404, 1992.

FURLANETO, M.C. Recombinação genética e produção de celulases em *Thricoderma pseudokoningii* var. rifai. Piracicaba: ESALQ/USP, 1989. 152p. (Dissertação Mestrado).

GOLDMAN, G.H.; TEMMERMAN, W.; JACOBS, D.; CONTRERAS, R.; VAN MONTAGU, M.; HERRERA-ESTRELLA, A. A nucleotide substitution in one of the β-tubulin genes of **Trichoderma viride** confers resistance to the antimitotic drug methyl benzimidazole-2-il-cabamate. **Molecular Genetics**, v.240, p.73-80, 1993.

GRIFFEE, P.J. Resistance to benomyl and related fungicides in **Colletotrichum musae, Transactions of the British Mycological Society**, v.60, p.433-437, 1973.

GROSSBARD, E. Effects on the soil microflora. **In**: AUDUS, L.J. ed. **Herbicides: physiology, biochemistry, ecology**. New York: Academic Press, 1976. p.99-147.

GUPTA, V.K.; SHARMA, S.D. Degradation of carbendazim in soil by micro-organisms. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v.59, p.21-24, 1989.

HAMMERSCHLAG, R.S.; SISLER, H.D. Benomyl and methyl-2-benzimidazolecarbamate (MBC): Biochemical, cytological and chemical aspects of toxicity to **Ustilago maydis** and **Saccaromyces cerevisae. Pesticide Biochemistry and Physiology,** v.3, p.42-54, 1973.

HASTIE, A.C. Benlate induced instability of **Aspergillus** diploids. **Nature** (London) v.226, p.771-773, 1970.

HASTIE, A.C.; GEORGOPOULOS, S.G. Mutational resistance to fungitoxic benzimidazole derivatives in **Aspergillus nidulans. Journal of Genetic Microbiology**, v.67, p.371-376, 1971.

HELWEG, A. Degradation and adsorption of carbendazim and 2-aminobenzimidazole in soil. **Pesticide Science**, v.8, n.1, p.71-78, 1977.

HELWEG, A. Influence of temperature, humidity and inoculation on the degradation of ^{14}C labeled 2-aminobenzimidazole in soil. **Water, Air and Soil Pollution**, v.12, p.275-279, 1979.

HELWEG, A. Microbial breakdown of the fungicide benomyl. **Soil Biology and Biochemistry**, v.4, p.377-378, 1972.

HELWEG, A. Persistence of benomyl in different soil types and microbial brakdown of the fungicide in soil and agar culture. **Tidsskrift for Planteavl**, v.77, p. 232-243, 1973.

HINE, R.B.; JOHNSON, D.C.; WENGER, C.J. The persistency of two benzimidazole fungicides in soil and their fungistatic activity against **Phymatotrichum omnivorum. Phytopathology**, v.59, p.798-803, 1969.

HOFER, I.; BECK, T.; WALLNOFER, P., Effect of fungicide benomyl on the microflora of soil. **Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, v.78, p.399-405, 1971.

JOHNSON,W.G.; LAVY, T.L. In-situ dissipation of benomyl, carbofuran, thiobencarb and triclopyr at three soil depths. **Journal of Environmental Quality**, v.23, p. 556-562, 1994.

JONES, A.L.; WALKER, R.J. Tolerance of **Venturia inaequalis** to dodine and benzimidazole fungicides in Michigan. **Plant Disease Reporter**, v.60, p.40, 1976.

JUNG, M.K.; OAKLEY, B.R. Identification of an amino acids substitution in the **ben A**, B-Tubulin gene of **Aspergillus nidulans** that confers thiabendazole resistance and benomy supersensitivity. **Cell Motil Citoskeleton**, v.17, p.87-94, 1990.

KAPPAS, A.; GEORGOPOULOS, S.G.; HASTI, A.C. On the genetic activity of benzimidazole and thiophanate fungicides on diploid **Aspergillus nidulans. Mutation Research**, v.26, p.17-23, 1974.

KAPUR, S.; BELTFIELD, W.; GIBSON, N.H.S. The effects of fungicides on the soil fungi with special reference to nematophogous species. **Pedobiologia**, v.21, p.172-177, 1981.

KAUFMAN, D.D.; KATAN, J. EDWARDS, D.F.; JORDAN, E.G. Microbial adaptation and metabolism of pesticides. In: HILTON, J.L., ed. **Agricultural chemicals of the future**. Totowa: Rowman & Allanheld, Publishers, 1985. p. 437-451.

KILGORE, W.W.; WHITE, E.R. Decomposition of the systemic fungicide 1991 (benlate). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 5, p.67-75, 1970.

KIMATI, H. Controle químico. IN: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. eds. **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronomica Ceres, 1995. p. 761-785.

KIRBY, A.H.M. Progress torwards systemic fungicides. **Pesticide Articles and News Summaries**, v.18, p.1-33, 1972.

LIU, L.X.; HSIANG, T. Bioassays for benomyl adsorption and persistence in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.26, p. 317-324, 1994.

MACRAE, I.C. Microbial metabolism of pesticide and structurally related compounds. **Review of Environmental Contamination and Toxicology**, v.109, p. 1-87, 1989

MATSUMARA, F.; BENEZET H.J. Microbrial degradation of insecticides. **In:** HILL, I.R.; WRIGHT, S.J.L., eds. **Pesticide microbiology**. New York: Academic Press, 1978. p. 623-667.

MISAGHI, I.J.; GROGAN, R.G.; DUMIWAY, J.M.; KIMBLE, K.A. Influence of environment and culture media on spore morphology of *Alternaria alternata*. **Phytopathology**, v. 68, p. 29-34, 1978.

MOORMAN, T.B. Pesticide degradation by soil microorganisms: environmental, ecological and management effects. In: HATFIELD, J.L.; STEWART, B.A., eds. **Soil biology. Effects on soil quality**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1994. p. 121-165.

MOUBASHER, A.H.; ABDEL-KADER, M.I.A.; ABDEL-MALLEK, A.Y. Effect of benomyl on soil, root surface and leaf-surface fungi. **Zentralblat fur Mikrobiologie**, v.139, p. 281-291, 1984.

MUGHOGHO, L.K. The fungus flora of fumigated soils. **Transactions of the Britrish Mycological Society**, v.51, p.441-459, 1968.

MUNNECKE, D.M.; JOHNSON,L.M.; TALBOT, H.W.; BARIK, S. Microbial metabolism and enzymology of selected pesticides. In: CHAKRABARTY, A.M., ed. **Biodegradation and detoxification of environmental pollulants**. Boca Raton: CRC Press, 1982. p.1-32.

MUSUMECI, M.R.; CAINELLI, V.C.B.; RUEGG, E.F. Persistencia do fungicida carbendazim em amostras de solo do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, v.5, n.31, p.305-309, 1980a.

MUSUMECI, M.R.; LORD, A.; FLORES-RWGG E. Adsorption, leaching and persistence of carbendazim in brazilian soils. **Reporter Biological Institute State Department of Agronomy**, São Paulo, Brazil, v.47, p.9-14, 1980b.

NETZER, D.; DISHON, I. Persistence of benomyl and thiophanate compounds in soil and various plants following soil application. **Phytoparasitica**, v.1, p.33-37, 1973.

OAKLEY, B.R.γ-tubulin: the microbule organizer? **Trends in Cell Biology**, v.2, p.1-5, 1992.

OAKLEY, B.R.; OAKLEY. C.E.; YOON, Y.; JUNG, M.K. γ-tubulin is a component of the spindle pole body that is essential for microtubule funtion in **Aspergillus nidulans. Cell**, v.61, p.1289-1301, 1990.

OAKLEY, C.E.; OAKLEY, B.R. Identification of γ-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by **mip** A gene of **Aspergillus nidulans. Nature**, v.338, p.662-664, 1989.

OKU, H.; OKI, K; SHIRAISH, T., SATO, K.; OUCHI, S. Effects of fungicides benomyl and thiran on soil microflora and some soil inhabitant fungi. **Science Reporter Faculty of Agronomy**. Okayama University, Japan, v.54, p.1-5, 1979.

ORBACH, M.J.; PORRO E.B.; YANOFSKY, C. Cloning and characterization of the gene for β-tubulin from a benomyl- resistant mutant of **Neurospora crassa** and its use as a dominant selectable marker. **Molecular Cell Biology**, v.6, p.2452-2461, 1986.

OSMANI, S.A.; OAKLEY, B.R. Cell cycle and tubulin mutations in filamentous fungi. In: BENNETT, J.W.; LASURE. L.L., eds. **More gene manipulations in fungi**. San Diego: Academic Press, 1991, p. 107-125.

PACCOLA-MEIRELES, L.D.; VALARINI, M.J.; AZEVEDO, J.L.; ALFENAS, A.C. **Manual de técnicas eletroforéticas em microrganismos**. Piracicaba: FEALQ, 1988. 54p.

PEEPLES, J.L. Microbial activity in benomyl-treated soils. **Phytopathology**, v.64, n.6, p.857-860, 1974.

PETRUNACK, D.M.; CHRIST, B.J. Isozyme variability in *Alternaria solani* and *A. alternata*. **Phytopathology**, v.82, p. 1343-1347, 1992.

PITBALDO, R.E.; EDGINGTON, L.V. Movement of benomyl in field soils as influenced by acid surfactantes. **Phytopathology**, v.62, p.513-516, 1972.

PONCHET, J.; TRAMIER, R. Effects du benomyl sur la croissance de l'ceillett et la microflora des sols tretés. **Annals of Phytopathology**, v.3, p.401-403, 1971.

PONTECORVO, G.; ROPER, J.A; FORBES, G. Genetic recombination without sexual reproduction in *Aspergillus niger*. **Journal of General Microbiology**, v.8, p.198-210, 1953.

PRASAD, B.; DUTT, B.L.; NAGAICH, B.B. Inducing sporulation in *Alternaria solani*. 1. Effect of water treatment. **Mycopathologia et Mycologia Apllicata**, v. 49, p. 141-146, 1973.

RAJAGOPAL, B.S.; BRAHAMAPRAKASH, G.P.; SETHUNATHAN, N. Degradation of carbofuram by enrichment cultures and pure cultures of bacteria from flooded soils. **Environmental Pollution Series.** A. v.36, 1984a.

RAJAGOPAL, B.S.; BRAHMAPRAKASH, G.P.; REDDY, B.R.; SINGH, U.D.; SETHUNATHAN, N. Effect and persistence of selected carbamate pesticides in soil. **Residue Reviews**, v.93, p.6-19, 1984b.

RAYNAL, G.; FERRARI, F. Remenence et action sur la microflore fongique du bénomyl utilisé en incorporation a un sol. **Phytiatr - Phytopharmacology** v.22, p.259-264, 1973.

RHODES, R.C.; LONG, J.D. Run-off and mobility studies on benomyl in soils and turf. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.12, p.385-387, 1974.

ROUCHAUD, J.P.; DECALLONE, J.R.; MEYER, J.A. Metabolism of 2-aminonobenzimidazole in melon plants. **Pesticide Science**, v.8, n.1, p.31-34, 1977a.

ROUCHAUD, J.P.; LHOEST, G.J.; MERCIER, M.J.; MEYER, J.A. Metabolism of benomyl in carrot, strawberry and apple. **Pesticide Science**, v.8, p.23-30, 1977b.

ROUCHAUD, J.P.; DECALLONE, J.R.; MEYER, J.A. Metabolic fate of methyl-2-benzimidazolecarbamate in melon plants. **Phytopathology**, v.63, n.12, p.1513-1571, 1974.

SEIBERT, D.; ZIMMERMANN, E.K.; LEMPERLE, E. Genetic effects of fungicides. **Mutation Research**, v.10, p.533-538, 1970.

SHERF, A.F.; MACNAB, A.A. **Vegetable diseases and their control.** New York: John Wiley and Sons, Inc., 1986. 728p.

SIEGEL, M.R. Benomyl-soil microbial interactions. **Phytopathology**, v.65, p.219-220, 1975.

SIEGEL, M.R.; SISLER, H.D. eds. **Antifungal compouds: Interaction in biological e ecological systems**. New York: Marcel Dekker, 1977. v.2, p.1-147.

SIMMONS, E.G. Typification of *Alternaria*, *Stemphyllium* and *Ulocladium*. **Mycologia**, v.59, p.75-82. 1967.

SINGH, R.P.; CHIBA, M. Determination of benomyl and its degradation products by chromatographic methods in water, wettable powder formulations and crops. **Journal of Chromatography**, v. 643, p. 249-260. 1993.

SINHA, A.P.; AGNIHOTRI, V.P.; SINGH, K. Persistence of carbendazim in soil and its effect on rhizosphere in fungi of sugar beet seedlings. **Indian Phytopathology**, v.33, p.21-27, 1980.

SMILEY, R.W.; CRAVEN, M.M.; Fungicides in Kentuchy bluegrass turf; effects on thatch and ph; **Agronomy Journal**, v.70, p.1013-1019, 1978.

SMITH, P.M.; WORTHING, C.R. Microbial degradation of soil- applied fungicides. **Report. Glasshouse Crops Research Institute**, v.1974, p.106, 1975.

SOLEL, Z.; SANDLER, D.; DINOOR A. Mobility and persistence of carbendazim and thiabendazole applied to soil via drip irrigation. **Phytopathology**, v.69, n.12, p.1273-1277, 1979.

SOLEL, Z.; SCHOOLEY, J.M.; EDGINGTON V. Uptake and translocation of benomyl and carbendazim (methyl benzimidazol-2-yl carbamate) in the symplast. **Pesticide Science**, v.4, p.713-728, 1973.

SOMASUNDARAM, L.; COATS, J.R. Influence of pesticide metabolites on the development of enhanced biodegradation. **In: Enhanced biodegradation of pesticides in the environment**. Washington: American Chemical Society, 1990. p. 128-140. (ACS Symposium Series, 426).

SPENCER, D.M.; SMITH, P.M.; WORTHING, C.R. Breabkdown of benomyl by soil microrganisms. **Report. Glasshouse Crops Research Institute**, v.1971, p.111, 1972.

STAUTON, N.P.; KAVANAGH, T. Resistance of pests and pathogens to pesticides. In: **Proceedings 8th British Insecticide and Fungicide Conference**, Brighton Research Report, v.1, p.1, 1975.

SULLIVAN, K.F. Structure and utilization of tubulin isotypes. **Annual Review of Cell Biology**, v.4, p.687-716, 1988.

TANAKA, T.; MURATA, N.; KATO, H. Behavior of nucleic and chromossomes during ascus development in matting between rice-strain or weeping lovegrass-strain and ragi-strain of *Pyricularia*. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, Tokyo, v.45, p. 182-191. 1979.

UNGARO, M.R.G.; AZEVEDO, J.L. Crescimento e esporulação de *Alternaria alternata* em diferentes condições de cultivo. **Fitopatologia Brasileira**, v.11, p. 75-82. 1986.

URENHA, L.C.; PRADELLA, J.G.C.; OLIVEIRA, M.S.; BONOMI, A. Produção de biomassa celular de Rizóbio. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R.S., eds. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília EMBRAPA-SPI, 1994. p. 95-138.

VALADARES, M.C.C. **Genética e produção de exoenzimas em linhagens de *Metarhizium anisopliae* var. anisopliae (Metsh) Sorokin**. Piracicaba ESALQ/USP. 1989. 160p. (Tese Mestrado).

VALENTA, J.R.; DICUOLLO, C.J.; FARE, L.R.; MILLER, J.A.; PAGANO, J.F.: Microbial transformation of methyl 5 (6) - butyl - 2 - benzimidazolecarbamate. **Applied Microbiology**, v.28, p.995-998, 1974.

VAN DEN BOOGERT, P.H.J.F. Nutritional requirements of the mycoparasitic fungus *Verticillium biguttatum*. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v. 95, p.149-156, 1989.

VAN FASSEN, H.G.; Effect of the fungicide benomyl on some metabolic processes and on number of bacterias and actinomycetes in the soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.6, p.131-133, 1974.

VONK, J.W.; SIJPESTEIJN, K. Metabolism. **In**: MARSH, R. H., ed. **Systemic fungicides**. London: Longman, 1977. p.160-175.

WAINWRIGHT, M.; PUGH, G. J. F. The effect of fungicides on certain chemical and microbial properties of soil. **Soil Biology and Biochemistry**,v.6, p.263-267, 1974.

WEEKS, R. E.; HEDRICK, H.G. Influence of a systemic fungicide on oxygen uptake by soil microrganisms. **Soil Science**, v.119, p.280-284, 1975.

WHITE, E. R.; BOSE, E. A.; OGAWA, J. M.; MANJI, B .T.; KILGORE, W. W. Thermal and base catalysed hydrolysis products of the systemic fungicide benomyl. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.21, n.4, p.616-618, 1973.

WINSLEY, R.N.; HUANG, C. M. Control of **Fusarium** with of muskmelon and other effects of benomyl soil drenches. **Canadian Journal of Microbiology**, v.16, p.615-620, 1970.

WOODCOCK, D. Microbial degradation of fungicides, fumigants and nematocides. **In**: HILL, I. R.; WRIGHT, S. J. L., eds. **Pesticide microbiology**. New York: Academic Press, 1978. p.731-780.

WOODCOCK, D. Structure-activity relationships. **In**: MARSH, R. W., ed. **Systemic fungicides**. London: Logman, 1977. p.32-84.

YARDEN, O. AHARONSON, N.; KATAN, J. Accelerated microbial degradation of methyl benzimidazol-2-ylcarbamate in soil and its control. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, p.735-739, 1987.

YARDEN, O.; KATAN J.; AHARONSON, N.; BEN-YEPHET, Y.; Delayed and enhanced degradation of benomyl and carbendazim in desinfested and fungicide treated soil. **Phytopathology**, v.75, p.763-767, 1985.

YARDEN, O.; SALOMON,R. ; KATAN, J.; AHARONSON, N. Involvement of fungi and bacteria in enhanced and nonenhanced biodegradation of carbendazim and other benzimidazole compounds in soil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 15-23, 1990.

YASUDA, Y.; HASHIMOTO, S.; SOEDA, Y.; NOGUCHI, T. Metabolism of thiophanate-methyl by pathogenic fungi and antifungal activity of its metabolites. **Annals of Phytopathological Society of Japan**. v.39, p.49-52, 1973.

ZBOZINEK, J.V. Environmental transformations of DPA, SOPP, benomyl and TBZ. **Residue Reviews**, v.92, p.114-155, 1984.

ZHENG, Y.; JUNG, M. K.; OAKLEY, B. R. γ-tubulin is present in **Drosophila melanogaster** and **Homo sapiens** and is associated with the centrosome. **Cell**, v.65, p.817-823, 1991.

APÊNDICE

Tabela 1: Dados experimentais para curva de calibração

Concentração (μg/ml)	Área	Concentração (μg/ml)	Área	Concentração (μg/ml)	Área
11	127,4076	11	146,3508	11	137,0590
27,5	321,0448	27,5	364,923	27,5	331,0265
55	635,8235	55	707,8186	55	694,6411
110	1354,057	110	1366,344	110	1334,364
220	2713,677	220	2729,730	220	2629,270
1*	R = 0,999	2*	R = 0,999	3*	R = 0,999

Concentração (μg/ml)	Área	Concentração (μg/ml)	Área	Concentração (μg/ml)	Área
11	139,2755	11	138,1705	11	155,6079
27,5	340,8904	27,5	331,6647	27,5	368,8794
55	691,6432	55	702,1538	55	748,9645
110	1374,430	110	1388,028	110	1335,620
220	2835,550	220	2776,056	220	2725,965
4*	R = 0,999	5*	R = 0,999	6*	R = 0,999

* Curva de calibração

Tabela 2. Dados experimentais para recuperação de carbendazim em meio de cultura. validação do método analítico.

Vol. inic. am. (ml)	dias	volume final (ml)	fator diluição	volume injet. (µl)	resposta área	µg/ml encontr.	curva calibr.
150	1	5	5	50	536,7028	45,0044	1
150	1	5	5	50	472,2572	39,8444	1
150	1	5	5	50	522,3876	43,8534	1
150	2	5	5	50	603,7114	47,3889	2
150	2	5	5	50	449,4794	34,8605	2
150	2	5	5	50	522,6412	40,8035	2
150	4	5	5	50	580,8812	47,3982	3
150	4	5	5	50	548,2532	44,6595	3
150	4	5	5	50	560,3792	45,6773	3
150	8	15	15	50	590,5576	47,0564	4
150	8	15	15	50	686,3024	54,4754	4
150	8	15	15	50	618,4935	49,221	4
150	15	50	0	50	1846,559	144,559	5
150	15	50	0	50	1826,296	143,217	5
150	15	50	0	50	1817,801	142,323	5
250	30	5	5	50	907,0013	71,5857	6
250	30	5	5	50	867,6774	68,3626	6

Tabela 3: Dados experimentais para análise de degradação de carbendazim em meio de cultura (BD - 50%) com *Alternaria alternata*, suplementado com 100µg/ml de carbendazim.

vol. inic. am. (ml)	dias	vol. final (ml)	fator diluição	vol. injet. (µl)	resposta área	µg/ml encont.	curva calib.
150	1	5	5	50	454,3956	38,3865	1
150	1	5	5	50	370,4934	31,6404	1
150	1	5	5	50	282,8594	24,5942	1
150	2	50	0	50	1371,978	109,796	2
150	2	50	0	50	1446,499	115,849	2
150	2	50	0	50	1338,724	107,095	2
150	4	50	0	50	1116,953	92,3956	3
150	4	50	0	50	1078,051	89,1302	3
150	4	50	0	50	1123,493	92,9446	3
150	8	15	15	50	120,3345	10,6197	4
150	8	15	15	50	136,9463	11,907	4
150	8	15	15	50	101,6947	9,1754	4
150	15	50	0	50	504,496	40,2337	5
150	15	50	0	50	488,186	38,9659	5
150	15	50	0	50	473,654	37,8362	5
250	30	50	0	50	743,199	58,1602	6
250	30	50	0	50	846,1829	66,6009	6
250	30	50	0	50	977,4938	77,3633	6

EMBRAPA
AINFO / CNPMA

EMBRAPA

Tese, 353

FICHA DO LIVRO

AUTOR SILVA, Célia M.M de Souza

TITULO: Biodegradação do fungicida Carbendazim.

DEVOLVER EM	NOME DO LEITOR
14/11/96	
11/1/98	

EMBRAPA

— BIBLIOTECA —