

DEGRADAÇÃO DO FUNGICIDA CLOROTALONIL POR *Arthrobacter* spp.

E. F. Fay, C. M. M. de S. Silva, I. S. de Melo, R. F. Vieira,
Embrapa Meio Ambiente - Caixa Postal 69 – Jaguariúna, SP, Brasil – CEP: 13820-000
e-mail: bethfay@cnpmembrapa.br

RESUMO

O clorotalonil, fungicida de amplo espectro, sofre degradação microbiológica mas pode ser persistente devido à adsorção/dessorção pelos colóides do solo. Pouco é relatado sobre o seu comportamento em solos tropicais. Bactérias degradadoras de clorotalonil foram isoladas, de solos provenientes da região de Guaiúba, SP, em meio de cultura mineral sólido suplementado com clorotalonil como única fonte de carbono. As bactérias isoladas e selecionadas, após crescimento em meio mineral líquido suplementado com diferentes concentrações do fungicida (20, 40 e 100 µg mL⁻¹), foram repicadas em meio mineral líquido suplementado com 20 µg mL⁻¹ de clorotalonil para estudo da degradação. Os resíduos foram quantificados por cromatografia gasosa. Bactérias que degradaram acima de 80% do composto orgânico foram caracterizadas através da metodologia convencional e molecular. Pela análise convencional seis organismos selecionados pertenciam ao grupo dos actinomicetos; na base de dados do RDP estes organismos foram identificados como: *Arthrobacter nicotinovorans*, *A. globiformis*, *A. ilicis* e *A. ureafaciens*. A incorporação de diferentes materiais orgânicos ao solo aumentou a comunidade de degradadores, diminuiu a biodisponibilidade, minimizando os efeitos adversos do clorotalonil. Este tipo de prática agrícola pode ser considerado uma técnica de biorremediação de relativo baixo custo detoxificando áreas com resíduos de clorotalonil.

INTRODUÇÃO

O clorotalonil (2,4,5,6-tetracloroisofaltonitrila-TPN) é um fungicida clorado de amplo espectro, amplamente utilizado no Brasil (Compêndio de Defensivos Agrícolas, 1987) nas culturas de grãos, legumes e frutas (Brasil, 1998). Embora sua aplicação seja foliar, análises de solos de regiões onde tal fungicida é utilizado têm apresentado valores residuais altos (Caux et al., 1996), causando preocupações ambientais.

É relatado pela literatura que a degradação do clorotalonil não segue um padrão como os outros pesticidas, sendo suprimida após aplicações repetidas (Katayama et al., 1991a). Esta supressão foi observada também por outros autores, após um longo período de aplicação do composto (Takagi & Wada, 1990). As explicações dadas para esta supressão abordam a sensibilidade dos microrganismos degradadores do clorotalonil ao próprio fungicida (Takagi & Wada, 1990) e a falta de matéria orgânica facilmente degradável (Katayama et al., 1991b). No entanto, o aumento da população degradadora ainda não foi explicado.

Considerando que os xenobióticos persistentes podem ser degradados no ambiente após um longo tempo de exposição em função da adaptação dos microrganismos e a escassez de bibliografia sobre o destino do clorotalonil em solos tropicais brasileiros,

realizou-se este trabalho com o objetivo de: identificar bactérias degradadoras do fungicida em solos com e sem histórico de aplicação deste composto e verificar o efeito da adição de material orgânico ao solo sobre a toxidez do clorotalonil na microbiota.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas, no município de Guaíra, SP, amostras de solos provenientes de áreas cultivadas com tomate, solos de mata e de área de descarte de embalagens, retiradas à profundidade de 0-20cm. A amostragem foi feita em 10 pontos selecionados ao acaso. Em cada ponto foram coletadas 4 sub-amostras, as quais foram misturadas para formar uma amostra composta. Em laboratório as amostras foram homogeneizadas, secas ao ar, tamisadas em peneiras de 2mm de malha e armazenadas a 4°C até as análises. As áreas agrícolas apresentavam histórico da aplicação do fungicida clorotalonil.

1. Isolamento e seleção de microrganismos resistentes e/ou degradadores de clorotalonil

Estas atividades foram realizadas em três fases. A primeira correspondeu ao isolamento dos microrganismos do solo pela técnica de diluição em placa. De cada amostra de solo foram retiradas 10g, as quais foram adicionadas a Erlenmeyers contendo 90mL de solução salina (0,85%). Após agitação, foram realizadas diluições em série de 10^{-1} a 10^{-4} . Aliquotas dessas diluições (100 μ L) foram plaqueadas em meio de cultura sólido, específico para o crescimento de bactérias (MC de Pontecorvo; MC de Pontecorvo + 20 μ g mL $^{-1}$ de clorotalonil) e fungos (meio de Martin; meio de Martin -dextrose + 20 μ g mL $^{-1}$ de clorotalonil). O clorotalonil foi usado como fator seletivo sendo adicionado ao meio em solução de acetona. As culturas foram incubadas à 25°C com três repetições. A avaliação foi realizada após 24 horas no caso das bactérias. Para os demais microrganismos a contagem foi feita respeitando-se o tempo de crescimento para cada um.

As bactérias (111 linhagens) crescidas nesta primeira fase, foram repicadas para Erlenmeyers contendo meio mínimo (MM) de Pontecorvo (líquido), suplementado com 20 μ g mL $^{-1}$ de clorotalonil. Os frascos foram incubados por 8 dias, à temperatura de 28°C, sob agitação constante. Após este período as linhagens foram selecionadas de acordo com a produção de massa celular.

Na terceira fase, as 36 linhagens bacterianas então selecionadas, foram novamente repicadas para Erlenmeyers contendo meio de cultura líquido (MM de Pontecorvo e Meio Completo de Pontecorvo) suplementado com diferentes concentrações do clorotalonil (20, 40 e 100 μ g mL $^{-1}$). O fungicida substituiu a fonte de carbono. As condições de incubação foram às mesmas já descritas. As bactérias foram avaliadas quanto ao seu potencial de crescimento na presença do fungicida como única fonte de carbono, sendo as selecionadas consideradas possíveis degradadoras do fungicida. Estas foram caracterizadas pela Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, por meio da metodologia convencional (morfologia e testes bioquímicos) e molecular (análise filogenética de seqüências parciais de rRNA 16S).

2. Avaliação da dissipação do clorotalonil

As linhagens bacterianas que cresceram na concentração mais alta do fungicida foram repicadas para frascos Erlenmeyers de 250mL, contendo meio de cultura líquido (MM de Pontecorvo) suplementado com $20\mu\text{g mL}^{-1}$ como fonte de carbono. Os frascos foram incubados sob agitação (130rpm) a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por vinte dias.

A determinação quantitativa do fungicida foi conduzida por cromatografia gasosa, após extração e purificação das amostras. As determinações foram feitas em triplicata. A concentração de clorotalonil foi quantificada utilizando o método de padrão externo. Para avaliar a presença de interferentes foi feita análise do meio de cultura e dos reagentes utilizados.

A extração do fungicida foi em fase sólida, utilizando-se como referência métodos descritos por Barbina et al. (1985), Nash (1990), Albanis & Hela (1995), com pequenas alterações. As colunas foram condicionadas com os seguintes solventes e respectivos volumes: 3mL de acetato de etila PR, 3mL de metanol PR e 6mL de água deionizada. As amostras (100mL) foram transferidas para a coluna de extração, após filtragem em papel Whatman nº 542, sem secagem prévia da coluna. Os cartuchos foram eluídos por gravidade com 5mL de acetato de etila PR e foram secos pela utilização de ar forçado (vácuo de 1,5 a 2,0 pol/Hg, por 1 hora). Os eluatos, que continham o analito, foram recolhidos em frascos graduados. Estes eluatos foram evaporados em corrente de nitrogênio e ressuspendidos em 10mL de n-hexano PR.

3. Enriquecimento de microrganismos degradadores com diferentes fontes de matéria orgânica

Foi utilizado solo cultivado com tomate, coletado à profundidade de 0-20cm, no município de Guaira, SP, o qual vinha recebendo aplicações de clorotalonil há dois anos, no mínimo. Este solo foi classificado como latossolo vermelho-escuro.

Em laboratório o solo foi tamizado em peneira de 2mm, homogeneizado e mantido com a umidade proveniente do campo, à temperatura de 5°C por uma semana. Após este período, o solo foi dividido em sub-amostras as quais receberam diferentes tratamentos pela adição ao solo de diferentes fontes de carbono e da aplicação de clorotalonil na dosagem de $30\mu\text{g g}^{-1}$ de solo. Como fontes de C foram usados resíduos de cultura (50% de soja + 50% de milho), esterco, glicose e o próprio fungicida. O resíduo da cultura, esterco e a glicose foram adicionados na proporção de 5%. Os tratamentos testemunhas consistiram de: I - solo sem adição de clorotalonil e material orgânico e II - solo somente suplementado com clorotalonil, sem fonte externa de carbono. Foram realizadas quatro repetições por tratamento nas seguintes épocas de avaliação: 0, 7 e 21 dias após a incorporação do fungicida.

Para facilitar a aplicação e distribuição do produto no solo, o clorotalonil foi diluído em acetona e incorporado em celite (1:99 p/p) (Motonaga et al., 1996).

Cada tratamento foi constituído por 150g de solo seco, distribuídos em sacos plásticos, com a boca vedada por papel higiênico preso por elástico, com a finalidade de

manter a oxigenação. A umidade do solo foi ajustada para 60% da capacidade de campo e foi monitorada ao longo do experimento. O conjunto de sacos plásticos foi mantido no escuro e temperatura constante de 26°C, por um período de sete dias. Após este período de incubação foi feita a incorporação de clorotalonil ao solo. Antes da adição do pesticida, como já citado, amostras de solo foram retiradas para a determinação dos parâmetros biológicos.

O efeito do fungicida, nos microrganismos do solo foi quantificado através de três metodologias: carbono da biomassa microbiana, respiração e contagem em placa. Todos os cálculos foram realizados tomando-se por base o peso da amostra, seca a 105°C por 24 horas.

a) Carbono da biomassa microbiana: O C da biomassa microbiana foi medido pelo método de extração-fumigação (Vance et al., 1987). Cinquenta gramas de solo foram separadas em duas amostras de 25g; uma amostra foi exposta ao clorofórmio por 24 h e então submetida à extração com 100 mL de K₂SO₄ 0,5 M. A outra amostra foi imediatamente submetida à extração. O C orgânico nos extratos foi determinado por digestão com dicromato de potássio. O conteúdo do C da biomassa microbiana foi calculado usando a seguinte relação:

$$C_{mic} = 2.64.Ec[1]$$

onde Ec é o C orgânico extraído do solo fumigado menos o C orgânico extraído do solo não fumigado.

b) Respiração: A respiração básica foi quantificada segundo a metodologia descrita por Dinwoodie & Juma (1988). Quarenta e cinco gramas de solo de cada tratamento foram colocados em *snap cap* de 50mL e acondicionados em frascos de dois litros, hermeticamente fechados, juntamente com outro becker contendo 10mL de NaOH 1N. O carbonato de sódio formado na reação entre NaOH e o CO₂ liberado, foi quantificado através da titulação da solução com HCl 0,5N, utilizando-se como indicador a fenolftaleína.

c) Contagem de microrganismos: Para estimar o número de microrganismos do solo, foi utilizada a técnica de diluição em série. Alíquotas do solo foram plaqueadas em meios de cultura para o isolamento de fungos, bactérias e actinomicetos cultiváveis, em meios semi-seletivos para esses microrganismos (fungo: meio de Martin; actinomicetos: agar amido-caseína; bactérias: meio agar nutriente) (Tuite, 1969).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram selecionadas 111 linhagens bacterianas isoladas nos meios de cultura contendo clorotalonil. Estas linhagens foram repicadas em meio de cultura líquido suplementado com clorotanolil e re-selecionadas as que apresentaram crescimento entre $0,9 \times 10^9$ e $2,1 \times 10^9$ colônias, considerando-se a escala de McFarland. Assim, as 36 linhagens re-selecionadas foram semeadas em meio de cultura (meio completo de Pontecorvo/MCP e meio mínimo de Pontecorvo/MMP). sem e com diferentes concentrações de clorotalonil. Comparando o crescimento das colônias bacterianas nos diferentes meios, verificou-se que no MCP houve crescimento de 7 linhagens, das quais apenas 1 não cresceu em MMP, o que indica o potencial destas linhagens como degradadoras de clorotalonil.

Estes microrganismos foram caracterizados, gênero e espécie, pela Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”. Através da análise convencional das colônias foi possível determinar que seis dos sete organismos selecionados como degradadores de clorotalonil, pertenciam ao grupo dos actinomicetos e através da análise na base de dados do RDP estes foram identificados como: *Arthrobacter nicotinovorans*, *A. globiformis*, *A. ilicis* e *A. ureafaciens* (Fundação André Tosello, 1999).

1. Avaliação da dissipação do clorotalonil

Houve dissipação de clorotalonil, na presença de todas as espécies de *Arthrobacter* selecionadas. Esta dissipação ou degradação foi expressa pela alta porcentagem de desaparecimento do composto parental (entre 96 e 99%) do meio de cultura, em 20 dias.

Foi observado nos cromatogramas obtidos, a presença de três metabólitos indicando possível substituição do cloro da molécula parental. Pelos resultados pode ser inferido que os metabólitos clorados substituídos serão posteriormente metabolizados. Os resultados obtidos por Katayama et al. (1997) também relatam a presença destes metabólitos.

Segundo Alexander (1999), a detoxificação é o papel mais importante desempenhado pelos microrganismos na transformação de xenobióticos, tornando-o menos ativo a uma ou mais espécies susceptíveis. A detoxificação resulta em inativação, sendo a substância toxicologicamente ativa, convertida a um produto inativo. Estas reações, entretanto, não são sempre detoxificação, pois pode ocorrer a formação de produtos mais tóxicos que os parentais, como é o caso do clorotalonil, com a formação de TPN-OH.

2. Enriquecimento de microrganismos degradadores com diferentes fontes de matéria orgânica

O efeito da matéria orgânica sobre as comunidades de bactérias e fungos foi diferenciado (Tabela 1) de acordo com a fonte de matéria orgânica utilizada.

Tabela 1: Efeito da adição de diferentes materiais orgânicos na microbiota do solo

Tratamentos*	Bactérias		Fungos		Actinomicetos	
	7D	21D	7D	21D	7D	21D
Cl _s C _s (I)	2.08.10 ⁴ b	5.67.10 ⁴ b	1.83.10 ³ b	2.17.10 ³ b	5.08.10 ³ a	2.58.10 ³ a
Cl _c C _s (II)	2.58.10 ⁴ b	5.08.10 ⁴ b	3.42.10 ³ b	1.08.10 ³ b	5.83.10 ³ a	1.83.10 ³ a
Cl _c C _{palha}	64.99.10 ⁴ a	49.67.10 ⁴ a	22.58.10 ³ a	12.5.10 ³ a	8.00.10 ³ a	14.33.10 ³ a
Cl _c C _{glicose}	3.25.10 ⁴ b	9.58.10 ⁴ b	14.99.10 ³ b	3.22.10 ³ b	3.33.10 ³ a	15.58.10 ³ a
Cl _c C _{esterco}	2.42.10 ⁴ b	8.17.10 ⁴ b	0.85.10 ³ ab	1.42.10 ³ ab	10.58.10 ³ a	18.25.10 ³ a

*Cl_sC_s (I): Solo sem clorotalonil e sem adição de matéria orgânica

Cl_c C_s (II): Solo com clorotalonil e sem adição de matéria orgânica

Cl_c C_{palha}: Solo com clorotalonil + palha

Cl_c C_{glicose}: Solo com clorotalonil + glicose

Cl_c C_{esterco}: Solo com clorotalonil + esterco

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de D.M.S. ao nível de 5% de probabilidade.

Em solos suplementados com clorotalonil e palha houve um aumento significativo de 3.124 e 876% aos 7 e 21 dias após a adição da matéria orgânica e do clorotalonil, respectivamente, em relação ao solo 1. Para os fungos este incremento foi de 1.233 e 576% aos 7 e 21 dias respectivamente, para suplementação com palha, diferindo significativamente das demais fontes de carbono. A baixa biodisponibilidade do clorotalonil, que poderia estar adsorvido à matéria orgânica, favoreceu este incremento uma vez que os parâmetros do solo e as características físico-químicas do fungicida é que determinam os efeitos adversos sobre os microrganismos (Ronday et al., 1997). O clorotalonil, fungicida não iônico, tem baixa solubilidade em água e um alto coeficiente de partição octanol-água, ficando, portanto, mais fortemente adsorvido na matéria orgânica.

Os actinomicetos apresentaram comportamento diferenciado quando comparados aos outros dois grupos de microrganismos (Tabela 1). Em todos os tipos de suplementação, houve incremento desta comunidade chegando a 555%, 603%, 707% em palhada, glicose e esterco, respectivamente, aos 21 dias, não havendo diferenças significativas entre eles. Estes dados corroboram os resultados obtidos no experimento anterior.

Os parâmetros C da biomassa microbiana e respiração (Tabela 2) demonstraram efeitos positivos da suplementação com palhada, sobre os microrganismos do solo, enquanto que, a suplementação com glicose apresentou estímulo somente nos primeiros sete dias de experimento.

Tabela 2: Carbono da biomassa microbiana (Cmic) e respiração

Tratamentos*	Cmic		Respiração	
	7D	21D	7D	21D
Cl _s C _s (I)	84.44a	111.84a	78.13a	56.96a
Cl _c C _s (II)	125.98a	81.80a	110.43a	22.61a
Cl _c C _{palha}	623.55a	406.06a	326.87a	2109.23a
Cl _c C _{glicose}	676.94a	162.6a	167.12a	278.72a
Cl _c C _{esterco}	119.92a	83.59a	109.96a	66.74a

*Cl_sC_s (I): Solo sem clorotalonil e sem adição de matéria orgânica

Cl_c C_s (II): Solo com clorotalonil e sem adição de matéria orgânica

Cl_c C_{palha}: Solo com clorotalonil + palha

Cl_c C_{glicose}: Solo com clorotalonil + glicose

Cl_c C_{esterco}: Solo com clorotalonil + esterco

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade.

O Cmic com a adição de palhada foi superior aos solos I e II, indicando que houve dissipação do clorotalonil. Este resultado sugere que a concentração utilizada (5%) de material orgânico foi suficiente para inibir o efeito adverso do fungicida sobre a microbiota do solo. Nos resultados observados aos 21 dias foi mantido o efeito inibitório sobre o Cmic, no caso da suplementação com a glicose. Este substrato serviu como fonte de C rapidamente metabolizável, deixando o clorotalonil biodisponível, podendo desta forma inibir Cmic.

A estimulação da atividade microbiana pela adição de matéria orgânica pode aumentar o co-metabolismo de altas concentrações de pesticidas em solos (Felsot &

Dzantor, 1995). A taxa de dissipação do clorotalonil, segundo Katayama et al. (1995), é também acelerada em solos com adição de material orgânico e tem sido atribuída principalmente à ação abiótica ou seja, às reações com o material orgânico adicionado. O efeito do clorotalonil sobre várias atividades microbianas também é descrito por Katayama et al., (1991b), Habte et al., (1992); Vieira et al., (2000, 2001). A introdução de resíduos de cultura pode oferecer uma maneira econômica e eficiente na estimulação necessária da microbiota do solo para aumentar a degradação de pesticidas, conforme observado neste trabalho. Por outro lado, a incorporação de resíduos de cultura, nas práticas agrícolas, pode auxiliar na diminuição da biodisponibilidade do fungicida, incorporando-o na matéria orgânica, ou mesmo, auxiliando na dissipação do composto através da degradação do mesmo pelo aumento da atividade biológica.

Segundo Frakes & Hicks (1993), o clorotalonil não permite o cultivo de certas culturas agrícolas dentro de um prazo de doze meses da aplicação. A incorporação de resíduos de culturas, no entanto, pode diminuir este tempo, considerando os resultados obtidos neste trabalho. O conteúdo de matéria orgânica tem importante papel na determinação do nível da atividade biológica do solo, reduzindo a biodisponibilidade do clorotalonil, aumentando o número de microrganismos degradadores e minimizando o efeito adverso do mesmo em microrganismos não-alvo, em áreas com níveis altos de resíduos deste fungicida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBANIS, T. A.; HELA, D. G. Multi-residue pesticide analysis in environmental water samples using solid-phase extraction discs and gas chromatography with flame thermionic and mass-selective detection. *Journal of Chromatography*, Amsterdam, v. 707, p. 283-192, 1995.
2. ALEXANDER, M. *Biodegradation and bioremediation*. 2 ed. New York: Academic Press, 1999. 453p.
3. BARBINA, M. T.; BAGAROLO, L.; PARONI, S. Metodo multiresiduo per la determinazione di fungicidi in frutta e ortaggi con gascromatografia capillare. *Informatore Fitopatologico*, Bologna, v. 12, p. 41-43, 1985.
4. BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Coordenação de Fiscalização de Agrotóxicos. *Agrofit" 98: Uso adequado de agrotóxicos*. Brasília, 1998. CD ROM.
5. CAUX, P. Y.; KENT, R. A.; FAN, G. T.; STEPHENSON, G. L. Environmental fate and effects of chlorothalonil: a Canadian perspective. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, Boca Raton, v. 26, p. 45-93, 1996.
6. COMPÊNDIO de DEFENSIVOS AGRÍCOLAS: guia prático para uso agrícola. Andrei, São Paulo, 1987, 492p.
7. DINWOODIE, G. D.; JUMA, N. G. Allocation and microbial utilization of C in two soils cropped to barley. *Canadian Journal of Soil Science*, Ottawa, v. 68, p. 495-505, 1988.
8. FELSOT, A. S.; DZANTOR, E. K. Effect of alachlor concentration and an organic amendment on soil dehydrogenase activity and pesticide degradation rate. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Elmsford, v. 14, p. 23-28, 1995.

9. FRAKES, R. A.; HICKS, L. R. Fungicides. In: CORN, M. (Ed.) *Handbook of hazardous materials*. San Diego: Academic Press, 1993. p. 293-308.
10. FUNDAÇÃO TROPICAL de PESQUISAS e TECNOLOGIA “ANDRÉ TOSELLO”. *Relatório técnico 98525: Identificação de microrganismos*. Campinas, 1998. 1v., não paginado.
11. HABTE, M., AZIZ, T., YUEN, J. E. Residual toxicity of soil-applied chlorothalonil on mycorrhizal symbiosis in *Leucaena leucocephala*. *Plant and Soil*, v. 140, 263-268, 1992.
12. KATAYAMA, A.; ISEMURA, H.; KUWATSUKA, S. Population change and characteristics of chlorothalonil-degrading bacteria in soil. *Journal of Pesticide Science*, Tokyo, v. 16, p. 239-245, 1991b.
13. KATAYAMA, A.; ISEMURA, H.; KUWATSUKA, S. Suppression of chlorothalonil dissipation in soil by repeated applications. *Journal of Pesticide Science*, Tokyo, v. 16, p. 233-238, 1991a.
14. KATAYAMA, A.; ITOU, T.; UKAI, T. Ubiquitous capability to substitute chlorine atoms of chlorothalonil in bacteria. *Journal of Pesticide Science*, Tokyo, v. 22, p. 12-16, 1997.
15. KATAYAMA, A.; MORI, T.; KUWATSUKA, S. Abiotic dissipation of chlorothalonil in soil accelerated by amendment with high applications of farmyard manure. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v. 27, p. 147-151, 1995.
16. MOTONAGA, K.; TAKAGI, K.; MATUMOTO, S. Biodegradation of chlorothalonil in soil after suppression of degradation. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v. 23, p. 340-345, 1996.
17. NASH, R. G. Solid-phase extraction of carbofuran, atrazine, simazine, alachlor, and cynazine from shallow well water. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, Washington, v. 73, p. 438-442, 1990.
18. RONDAY, R.; POLMAN, A. M. M. K.; DEKKER, A.; HOUX, N. W. H.; LEISTRA, M. Persistence and toxicological effects of pesticides in topsoil: use of the equilibrium partitioning theory. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Elmsford, v. 16, p. 601-607, 1997.
19. TAKAGI, K.; WADA, H. A long-term change in biodegradation of a fungicide chlorothalonil: (TPN) in upland soils. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF SOIL SCIENCE, 14., 1990, Kyoto. *Transactions...* Kyoto, 1990. v. 3, p. 196-201.
20. TUIITE, J. *Plant Pathological methods: fungi and bacteria*. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1969, p. 239.
21. VANCE, E. D.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D. S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v. 19, p. 703-707, 1987.
22. VIEIRA, R. F.; SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F. Efeito da suplementação orgânica sobre a toxidez do fungicida clorotalonil na microbiota do solo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 36, n. 12, p. 1555-1560, dezembro 2001.
23. VIEIRA, R. F.; SILVA, C. M. M. S.; MAIA, A. H. N.; FAY, E. F.; COELHO, K. C. An appraisal of five methods for the measurement of the fungal population in soil treated with chlorothalonil. *Pest Management Science*, Oxford, v. 56, p. 431-440, 2000.