

ACÇÃO DOS XENOBIÓTICOS FENARIMOL, METALAXIL E PACLOBUTRAZOL NA COMUNIDADE FÚNGICA DO SOLO

E. F. Fay, C. M. M. de S. Silva, R. F. Vieira

Embrapa Meio Ambiente - Caixa Postal 69 – Jaguariúna, SP, Brasil – CEP: 13820-000

e-mail: bethfay@cnpma.embrapa.br

RESUMO

Como os fungos são os decompositores primários no solo é importante avaliar o efeito dos xenobióticos nesta comunidade. Os parâmetros avaliados foram o conteúdo de ergosterol, comprimento da hifa viva e o carbono da biomassa microbiana. Os experimentos foram feitos em casa de vegetação na Embrapa Meio Ambiente, localizada em Jaguariúna, SP, Brasil, usando solo arenoso. Os fungicidas metalaxil (0; 0,5 e 50 $\mu\text{g a.i.g}^{-1}$ de solo), fenarimol (0; 0,12 e 1,2 $\mu\text{g a.i.g}^{-1}$ de solo) e o regulador de crescimento vegetal paclobutrazol (0; 80 e 160 $\mu\text{g a.i.g}^{-1}$ de solo), foram utilizados para suplementação do solo. Solos sem a adição dos xenobióticos foram utilizados como controles. A biomassa microbiana C (Cmic) foi afetada significativamente pelas doses dos xenobióticos e pelo tempo, mas as flutuações de Cmic no tempo não foram consistentes com os diferentes xenobióticos. O conteúdo de ergosterol do solo controle aumentou no início do experimento. Comparados a este tratamento, os solos suplementados com paclobutrazol e metalaxil não apresentaram efeitos significativos. A adição de fenarimol diminuiu o conteúdo de ergosterol do solo, em cerca de 90% quando comparado ao controle no 7º dia após aplicação. O efeito inibitório do fenarimol não foi observado após 42 dias da aplicação. O comprimento da hifa viva variou de 0,05 a 0,67m g⁻¹ de solo seco no tratamento com paclobutrazol. Entretanto, os valores para comprimento da hifa viva observados nos solos tratados com fenarimol e metalaxil foram maiores, variando de 0,16 a 2,62m g⁻¹ de solo seco. O conteúdo de ergosterol e o comprimento de hifa viva foram indicadores mais sensíveis dos efeitos colaterais dos xenobióticos do que a medida da biomassa microbiana. O fungicida fenarimol foi o mais deletério para a comunidade fúngica.

INTRODUÇÃO

A aplicação de xenobióticos nos sistemas agrícolas tem o potencial de exercer alguns efeitos colaterais na biomassa do solo. Muitos estudos encontraram que estes compostos orgânicos afetam adversamente o crescimento, a morfologia e as atividades bioquímicas dos microrganismos, resultando numa diminuição da biomassa e diversidade (Kozdrój and van Elsas, 2001), e mesmo modificações nas características microbianas nos solos contaminados (Chen et al., 2000). Os fungos são os decompositores primários e apesar de sua importância no ecossistema terrestre, são vulneráveis aos danos ocasionados pelos fungicidas que podem ficar acumulados no solo (Vieira et al., 2000).

Várias técnicas têm sido usadas para quantificar os fungos no solo. Métodos indiretos para estudo dos fungos consistem na determinação da seleção de biomoléculas características de grupos específicos de organismos. As análises podem ser qualitativas ou quantitativas. A determinação indireta quantitativa envolve a análise do ergosterol, método este que indica a biomassa de fungos eucomicetos, incluindo membros dos zigomicota, ascomicota, basidiomicota e deuteromicota (Weete, 1989). Assim, o ergosterol é restrito a um grupo, taxonomicamente e ecológicamente bem definido de organismos. Sendo principalmente um componente de membrana (comumente próximo a 0,5% da massa orgânica) ele é indicativo do conteúdo citoplasmático de células metabolicamente ativas, portanto, basicamente um indicador de células fúngicas vivas (Kuhn et al., 1990; Newell, 1992), portanto detecções analíticas não são problemáticas (Gessner & Chauvet, 1993; Newell, 1994).

A premissa da análise do ergosterol e técnicas semelhantes é que existe uma interrelação entre a concentração de um constituinte celular selecionado e a quantidade de biomassa existente (Newell, 1992 e 1995).

A descoberta de que os compostos que bloqueiam a biossíntese de esteróis impedem o crescimento fúngico levaram ao desenvolvimento de uma série de moléculas derivadas dos azóis, piridinas, pirimidinas e piperazinas, as quais são as mais importantes representantes do grupo dos triazóis e imidazóis. O aumento do uso destes compostos, agravado pelo amplo espectro de atividade, demanda uma avaliação completa dos seus efeitos colaterais na comunidade fúngica do solo. Portanto, o objetivo deste estudo foi o de avaliar o efeito do paclobutrazol, fenarimol e metalaxyl, na comunidade fúngica do solo através do conteúdo de ergosterol, carbono da biomassa microbiana e comprimento da hifa viva.

MATERIAL E MÉTODOS

Um solo franco-arenoso foi usado com as seguintes características físico-químicas: pH (H₂O)= 5,4; capacidade de troca catiônica 19,4mmol_C dm⁻³; matéria orgânica 9,3g dm⁻³; argila 142,1g kg⁻¹, areia 765,1g kg⁻¹, e silte 82,7g kg⁻¹.

O delineamento utilizado foi o de blocos ao acaso com quatro repetições. Os tratamentos utilizados com os fungicidas foram: metalaxil (0; 5,0 e 50 µg a.i.g⁻¹ de solo), fenarimol (0; 0,12 e 1,2 µg a.i.g⁻¹ de solo) e o regulador de crescimento vegetal paclobutrazol (0; 80,0 e 160,0 µg a.i. g⁻¹ solo). Solos sem a aplicação dos xenobióticos foram usados como controles. A unidade experimental utilizada foi uma caixa branca de plástico, sem drenagem, contendo 20kg de solo. Antes da adição dos xenobióticos nas unidades experimentais, o solo permaneceu durante sete dias nas caixas tendo sido mantida a umidade entre 60-70% da capacidade de campo (CC). No final deste período, as avaliações iniciais dos parâmetros microbiológicos foram feitas e então adicionados os xenobióticos. Cada xenobiótico foi adicionado em água suficiente para manter o solo entre 60-70% da CC. Os períodos de tempo após a adição de cada um dos xenobióticos ao solo para as avaliações foram: paclobutrazol: 3, 14 e 21 dias; fenarimol e metalaxil: 0, 7, 14, 21,

42 e 119 dias. A temperatura do solo também foi monitorada, e permaneceu entre 23 a 28°C durante todo o período experimental, sendo estas as temperaturas típicas da área.

Os cálculos foram feitos baseados no peso da amostra seca a 105°C, por 24h.

1. Carbono da biomassa microbiana

Cinquenta gramas de solo foram separadas em duas amostras de 25g; uma amostra foi exposta ao clorofórmio por 24h e então submetida à extração com 100mL de K₂SO₄ 0,5M. A outra amostra foi imediatamente submetida à extração. O carbono (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:

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

onde Ec é o C orgânico extraído do solo fumigado menos o C orgânico extraído do solo não fumigado (Vance et al., 1987).

2. Comprimento de hifa viva

Água sob pressão foi adicionada a 20g de solo contidos em um becker de 500mL. A suspensão foi vertida em peneiras de 0,71 e 0,25mm, montadas sobre um funil e um becker de 2 litros. As peneiras foram lavadas com um forte jato de água e a suspensão (1,5 litros) transferida para um liquidificador, onde foi agitada por 10seg. a baixa velocidade, para garantir a dispersão dos agregados; a mistura permaneceu em repouso por 2min. antes de ser lentamente vertida em uma peneira de 44mesh. O material retido nesta peneira foi suspenso em tampão fosfato (pH 7,4; KH₂PO₄ 0,1M + NaOH 0,1M; 10mL). Para a determinação do comprimento de hifas vivas, 5mL dessa suspensão foi misturada com 5mL da solução de diacetato de fluoresceína (FDA) (Bloem et al., 1995). O FDA (5mg) foi dissolvido em 2mL de acetona (Nogueira & Cardoso, 2000). Após incubação à temperatura ambiente por 5min. as hifas foram colhidas por filtração em um filtro Millipore quadriculado (0,45µm). O comprimento das hifas fluorescentes foi determinado utilizando-se luz ultravioleta emitida em microscópio epifluorescente. Para esse comprimento de onda utilizou-se um filtro azul. O comprimento das hifas foi quantificado em 64 quadrados delineados no centro do filtro, com magnificação de 60X. O comprimento de hifas vivas foi calculado de acordo com a equação de Newman (Newman, 1966).

$$R = (\pi.A.n)/2.H \quad [2]$$

onde: R é o comprimento do micélio extraradicular avaliado nos 64 campos do filtro Millipore (mm); A é a área do filtro; n é o número de intersecções das hifas sobre as linhas horizontais da grade reticulada da ocular; H é o comprimento total das linhas horizontais do grade.

3. Conteúdo de ergosterol no solo

O conteúdo de ergosterol no solo foi avaliado utilizando-se o método proposto por Eash (1996) com poucas modificações. Em tubos de centrífuga contendo 5g de solo foram adicionados 15mL de metanol, 5mL de solução de hidróxido de potássio (40g L⁻¹ de KOH a 95% em etanol), homogeneizados em vortex por poucos segundos, e sonificados por 1min. A mistura de extração foi transferida e colocada em banho-maria a 80-83^oC por 15min., homogeneizada em vortex, retornando para mais 15min. em banho-maria. Os tubos foram resfriados em água corrente. A mistura de extração foi filtrada em papel Whatman n^o 1, e lavada com 5mL de água e 10mL de metanol. O filtrado foi transferido para funil de separação de 125mL e extraído com hexano (3x10mL). Os extratos foram combinados e concentrados até aproximadamente 2-3mL em evaporador rotatório a vácuo à temperatura de 42-43^oC, transferidos para tubos graduados de 10mL, elevados ao volume de aproximadamente 6mL e então levados à secura utilizando-se corrente de N₂. As amostras foram ressuspensas em 4mL de metanol, homogeneizadas e filtradas em filtros HV Millex (0,45µm). A determinação do ergosterol foi realizada em 4 replicatas para cada dose e em 4 amostras adicionadas do padrão de ergosterol a 0,2µg g⁻¹ de solo (amostra fortificada). As amostras extraídas foram analisadas por HPLC. O sistema consiste de uma bomba Shimadzu LC-10AD e detector UV-VIS SPD-10AV, com o integrador Cromatopac CR7A. O comprimento de onda utilizado foi de 282nm. A coluna C18, de fase reversa, Shim-Pack CLC-ODS (250cm x 4.6mm x 5.0µm) a temperatura ambiente. O sistema foi operado isocriticamente com 100% de metanol, com fluxo de 0.8ml min⁻¹ e um *loop* de 20µl foi usado para a injeção. O tempo de retenção foi de aproximadamente 20min. Os dados obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram quantificados pela altura do pico nas amostras e comparados aos padrões da curva de calibração preparados com ergosterol. A molécula de ergosterol foi confirmada pela comparação dos tempos de retenção com o padrão externo ou por coinjeção com o padrão.

4. Análise estatística

O coeficiente de correlação de Pearson foi usado para descrever as relações entre conteúdo de ergosterol do solo, comprimento da hifa viva e o carbono da biomassa microbiana. Análises de variância foram usadas para verificar a influência dos fatores estudados, usando o teste F para determinar as interações significativas, e o teste de Dunnett (P ≤ 0.05) para comparar as médias dos tratamentos com o controle (Dunnett, 1955).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios encontrados para o carbono da biomassa microbiana, conteúdo de ergosterol e comprimento da hifa viva para cada xenobiótico avaliado estão apresentados nas Tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1: Efeito colateral do fenarimol, metalaxil e paclobutrazol no carbono da biomassa microbiana, em solos arenosos.

Período de incubação (dias)	Metalaxil		
	Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$ solo)		
	0,0	0,5	50,0
0	67,24±0,00a	67,24±0,00a	67,24±0,00a
7	111,56±30,56a	96,92±30,81a	100,75±11,27a
14	62,62±18,40a	59,55±10,12a	47,69±14,16a
42	120,03±15,97a	62,88±24,63a	81,17±15,35a
119	14,96±15,01a	21,07±15,22a	27,12±20,53a

Período de incubação (dias)	Fenarimol		
	Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$ solo)		
	0,0	0,12	1,20
0	67,24±0,00a	67,24±0,00a	67,24±0,00a
7	111,56±30,56a	87,59±22,78a	86,70±12,08a
14	62,62±18,40a	53,90±7,36a	57,30±5,95a
42	120,03±15,97a	83,90±38,19b	68,80±36,13a
119	14,96±15,01a	12,60±0,06a	17,90±15,23a

Período de incubação (dias)	Paclobutrazol		
	Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$ solo)		
	0,0	80,0	160,0
3	86,9±18,96b	130,7±16,5b	136,4±19,82a
15	48,55±19,27a	86,57±28,55a	105,6±22,00a
21	12,27±6,11a	12,44±6,27a	9,67±1,53a

Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si. Dunnett ($P \leq 0.05$).

A concentração do carbono da biomassa microbiana (Cmic) do solo nas diferentes datas é mostrada na Tabela 1. Embora a interação tempo*tratamento não tenha sido significativa para os três xenobióticos utilizados, a Cmic foi significativamente afetada pela dose do xenobiótico e tempo de exposição. As flutuações de Cmic durante o período experimental não foram consistentes para os diferentes xenobióticos, com a Cmic permanecendo relativamente estável até o 7º dia. O fenarimol e o metalaxil apresentaram a Cmic ($P < 0.01$) mais baixa no 14º dia. O paclobutrazol teve um aumento significativo de Cmic ($P < 0.01$) após o 3º dia de incubação para ambas as doses. O aumento foi de aproximadamente 53% e aparentou ser temporário porque após este tempo a Cmic permaneceu quase que constante durante todo o período experimental.

Tabela 2: Efeito colateral do fenarimol, metalaxil e paclobutrazol no conteúdo de ergosterol em solos arenosos.

Período de incubação (dias)	Metalaxil		
	Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$ de solo)		
	0,0	0,5	50,0
0	2,23 \pm 0,00a	2,23 \pm 0,00a	2,23 \pm 0,00a
7	2,80 \pm 0,58a	2,28 \pm 0,42a	2,38 \pm 0,51a
14	1,70 \pm 0,60a	1,90 \pm 0,16a	1,57 \pm 0,44a
42	0,16 \pm 0,04b	1,32 \pm 0,08b	1,32 \pm 0,59a
119	0,14 \pm 0,03a	0,14 \pm 0,03a	0,15 \pm 0,03a

Período de incubação (dias)	Fenarimol		
	0,0	0,12	1,20
	0	2,23 \pm 0,00a	2,23 \pm 0,00a
7	2,80 \pm 0,58b	0,26 \pm 0,07b	0,19 \pm 0,02a
14	1,71 \pm 0,60a	1,71 \pm 0,87b	0,25 \pm 0,06a
42	0,16 \pm 0,04b	1,41 \pm 0,16b	1,70 \pm 0,47a
119	0,14 \pm 0,03a	0,17 \pm 0,07a	0,20 \pm 0,06a

Período de incubação (dias)	Paclobutrazol		
	0,0	80,0	160,0
	3	0,36 \pm 0,02a	0,24 \pm 0,04a
15	0,15 \pm 0,02a	0,28 \pm 0,13a	0,14 \pm 0,05a
21	0,13 \pm 0,08a	0,15 \pm 0,09a	0,10 \pm 0,03a

Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si. Dunnett ($P \leq 0.05$).

O conteúdo de ergosterol do solo no tratamento controle aumentou desde o primeiro dia da avaliação (Tabela 2). Este aumento foi próximo a 95% para o paclobutrazol. Comparado ao tratamento controle, solos suplementados com o regulador de crescimento nas doses de 80 e 160 $\mu\text{g g}^{-1}$ não mostraram alterações significativas para este parâmetro. O mesmo comportamento foi observado nos solos suplementados com metalaxil.

A adição de fenarimol ao solo diminuiu o teor de ergosterol em aproximadamente 90% quando comparado ao controle, no 7º dia de avaliação, em ambas as doses. A partir do 14º dia a população fúngica começou a se recuperar onde foram aplicadas as menores doses de fenarimol (0,12 $\mu\text{g g}^{-1}$), com efeito inibitório de aproximadamente 41%, quando comparada ao controle. No final do experimento o conteúdo de ergosterol dos solos tratados com metalaxil e fenarimol foi praticamente os mesmos do solo controle. Isto significa que o conteúdo de ergosterol do solo em todos os tratamentos, incluindo o controle, atingiram praticamente a mesma concentração, em torno de 0,14 $\mu\text{g g}^{-1}$ de solo. Também indica que o efeito destes dois fungicidas possa ser transiente ou que possa ter resultado da morte da população inicial ou da perda de suas atividades metabólicas em baixas concentrações de substrato.

Tabela 3: Efeito colateral do fenarimol, metalaxil e paclobutrazol no comprimento de hifa viva, em solos arenosos.

Período de incubação (dias)	Metalaxil		
	Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$ solo)		
	0,0	0,5	50,0
0	2,12 \pm 0,00a	2,12 \pm 0,00a	2,12 \pm 0,00a
7	2,09 \pm 0,43a	1,50 \pm 0,31a	1,37 \pm 0,06a
14	2,60 \pm 0,55a	2,22 \pm 0,58a	2,62 \pm 0,53a
42	1,78 \pm 0,27a	1,39 \pm 0,58a	1,40 \pm 0,42a
119	0,39 \pm 0,07a	0,26 \pm 0,07a	0,42 \pm 0,10a

Período de incubação (dias)	Fenarimol		
	Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$ solo)		
	0,0	0,12	1,20
0	2,12 \pm 0,00a	2,12 \pm 0,00a	2,12 \pm 0,00a
7	2,10 \pm 0,43a	1,19 \pm 0,47a	1,62 \pm 0,49a
14	2,59 \pm 0,55a	2,34 \pm 0,48a	2,06 \pm 0,95a
42	1,78 \pm 0,27a	1,79 \pm 0,52a	1,64 \pm 0,35a
119	0,39 \pm 0,07a	0,38 \pm 0,07b	0,67 \pm 0,14a

Período de incubação (dias)	Paclobutrazol		
	Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$ solo)		
	0,0	80,0	160,0
3	0,22 \pm 0,03a	0,67 \pm 0,31a	0,24 \pm 0,11a
15	0,17 \pm 0,06a	0,13 \pm 0,08b	0,07 \pm 0,02a
21	0,26 \pm 0,04b	0,06 \pm 0,03b	0,05 \pm 0,01a

Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si. Dunnett ($P \leq 0.05$).

Estimativas do comprimento da hifa viva para cada xenobiótico aplicado, baseadas na medida do comprimento da hifa viva, variaram entre 0,05 to 0,67m g^{-1} solo seco (Tabela 3), no solo incubado com paclobutrazol. A maior dose (160 $\mu\text{g g}^{-1}$ solo) diminuiu significativamente quando comparada ao controle após 15 (58%) e 21 (99%) dias de incubação. Entretanto, os comprimentos da hifa viva nos solos tratados com fenarimol e metalaxil foram maiores e variaram entre 0,16 a 2,62m g^{-1} solo (Tabela 2), mas os tratamentos não foram significativamente diferentes.

O conteúdo de ergosterol e o comprimento da hifa viva foram indicadores mais sensíveis dos efeitos colaterais de xenobióticos do que a medida do carbono da biomassa microbiana. Se considerarmos o carbono lábil da fumigação como uma medida da biomassa microbiana total (Bc), a relação do conteúdo de ergosterol com Bc pode ser considerada como uma medida indicadora da contribuição relativa dos fungos em relação à biomassa microbiana total. Em solos ácidos, como este em que foi feito o experimento (pH=5,4), os fungos podem contribuir relativamente mais para a biomassa quando comparados às outras comunidades microbianas do solo, pois o ambiente ácido é mais favorável ao crescimento fúngico em relação ao bacteriano. Entretanto isto não foi observado nos resultados obtidos para Cmic.

As médias da relação do conteúdo de ergosterol-C da biomassa microbiana foram de 0,8; 1,8, e 4,1% nos solos suplementados com fenarimol, metalaxil e paclobutrazol, respectivamente. Estas razões foram muito baixas nos solos suplementados com fenarimol, o que não é surpreendente uma vez que ele é um inibidor da biossíntese de ergosterol. De acordo com Salamanca et al. (2002), razões muito baixas de ergosterol-C da biomassa microbiana indicam que a biomassa microbiana destes solos é dominada por bactérias, mas a hipótese de que os fungos desde experimento tenham um baixo conteúdo de ergosterol não pode ser excluída.

Podemos considerar que o comprimento da hifa viva e o conteúdo de ergosterol do solo são medidas da biomassa fúngica viva do solo. A razão entre o conteúdo de ergosterol e o comprimento da hifa viva presentes nos solos também foi calculada. As razões médias foram 0,90; 0,42 e 2,10 μg ergosterol g^{-1} pelo comprimento da hifa viva para o metalaxil, fenarimol e paclobutrazol, respectivamente. A relação entre o conteúdo específico de ergosterol e a biomassa fúngica viva podem ser influenciadas por: a) estado metabólico da comunidade fúngica, b) composição das espécies da comunidade fúngica, e c) a taxa de recuperação de ergosterol (Stahl & Parkins, 1996). Estes resultados sugerem que diferentes xenobióticos atuam em diferentes espécies fúngicas. O ergosterol não é produzido por todos os fungos e a sua concentração varia entre as diferentes espécies fúngicas, assim como também dentro da mesma espécie, dependendo do estado fisiológico dos fungos (Newell et al., 1987).

Os resultados deste estudo demonstraram que o fenarimol é o xenobiótico mais danoso para os fungos do solo, e que o conteúdo de ergosterol foi o indicador mais sensível para os efeitos colaterais ocasionados pelos xenobióticos estudados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BLOEM, J.; BOLHUIS, P. R.; VENINGA, M. R.; WIERINGA, J. Microscopic methods for counting bacteria and fungi in soil. In: ALEF, K.; NANNIPIERI P. (Ed.). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. London: Academic Press, 1995. p.162-173.
2. CHEN, S. K.; EDWARDS, C. A.; SUBLER, S. A. Microcosm approach for evaluating the effects of the fungicides benomyl and captan on soil ecological processes and plant growth. *Applied Soil Ecology*, v. 18, p. 69-82, 2000.
3. DUNNETT, C. W. A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *Journal of the American Statistical Association*, v. 50, p. 1096-1121, 1955.
4. EASH, N. S.; STAHL, P. D.; PARKIN, T. B.; KARLEN, D. L. A simplified method for extraction of ergosterol from soil. *Soil Science Society of America Journal*, v. 60, p. 468-471, 1996.
5. GESSNER, M.O ; CHAUVET, E. Importance of stream microfungi in controlling breakdown rates of leaf litter. *Ecology*, v. 75, p. 1807-1817, 1993.

6. KOZDRÓJ, J.; VAN ELSAS, J. D. Structural diversity of microbial communities in arable soils of a heavily industrialized area determined by PCR-DGGE fingerprinting and FAME profiling. *Applied Soil Ecology*, v. 17, p. 31-42, 2001.
7. KUHN, P. J.; TRINICI, A. P. J.; JUNG, M. J.; GOOSEY, M. W.; COPPING, L. G. (Ed.). *Biochemistry of cellwalls and membranes in fungi*. Berlin: Springer-Verlag, 1990.
8. NEWELL, S.Y. Estimating fungal biomass and productivity in decomposing litter. In: CAROLL, G.G.; WICKLOW, D.T. (Ed.). *The fungal community: its organization and role in the ecosystem*. New York: Marcel Dekker, 1992. p. 521-561.
9. NEWELL, S.Y. Total and free ergosterol in mycelia os saltmarch ascomycetes with sccess to whole leaves or aqueous extracts of leaves. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, p. 3479-3482, 1994.
10. NEWELL, S.Y. Minimiaiing ergosterol loss during preanalysis hendling and shipping of samples of plant litter. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, p. 2794-2797, 1995.
11. NEWELL, S.Y.; MILLER, J. D.; FALLON, R. D. Ergosterol content of salt-marsh fungi: effect of growth conditions and mycelial age. *Mycologia*, v. 79, p. 688-695, 1987.
12. NEWMAN, E. I. A method for estimating the total length of root in a sample. *Journal of Applied Ecology*, v. 3, p.139-145, 1966.
13. NOGUEIRA, M. A.; CARDOSO, E. J. B. N. Produção de micélio externo por fungos micorrízicos arbusculares e crescimento de soja em função de doses de fósforo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 24, p. 329-338, 2000.
14. SALAMANCA, E. F.; RAUBUCH, M.; JOERGENSEN, R.G. Reationships between soil microbial índices in secondary tropical Forest soils. *Applied Soil Ecology*, v. 21, p. 211-219, 2002.
15. STAHL, P. D.; PARKINS, T. B. Relationship of soil ergosterol concentration and fungal biomass. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 28, p. 847-855, 1996.
16. VANCE, E.D., BROOKES, P.C., JENKINSON, D.S., 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 19, p. 703-707.
17. 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*, v. 56, p. 431-440, 2000.
18. WEETE, J. D. Structure and function of sterols in fungi. *Advances in Lipid Research*, v. 23, p. 115-167, 1989.