

Efeito do Fungicida Metalaxil na Microbiota do Solo da Região Semi-Árida Brasileira

Célia Maria Maganhotto de Souza Silva; Rosana Faria Vieira e Elisabeth Francisconi Fay

Introdução

Na região semi-árida brasileira está concentrada uma grande parte da fruticultura do país. As práticas agrícolas utilizadas nestas áreas podem afetar o equilíbrio do ecossistema solo como, por exemplo, no caso do uso de agrotóxicos. Estes compostos orgânicos têm um papel benéfico na produtividade agrícola, no entanto, são potenciais poluidores ambientais. Eles chegam ao solo por meio da aplicação direta e também como resultado de atividades não agrícolas. Uma vez no solo, normalmente afetam os processos bioquímicos e microbiológicos.

A ocorrência de interferência do fungicida metalaxil nas propriedades biológicas e bioquímicas do solo, relacionadas à qualidade deste sistema, restringem-se a alguns poucos trabalhos, principalmente quando se considera solos de regiões áridas. A atividade microbiana é sempre dependente da temperatura do solo, umidade e disponibilidade de C orgânico. Estes solos são difíceis de recuperar após os efeitos do uso e/ou manejo inadequados, o que pode levar a uma permanente degradação e perda de produtividade (PASCUAL et al., 2000).

Efeito do metalaxil sobre a microbiota do solo

Para avaliar o efeito do fungicida metalaxil sobre microbiota de solos da região semi-árida brasileira, foi conduzido um experimento em casa-de-vegetação, utilizando solo coletado em plantio comercial de uva na região de Petrolina, PE. Esse solo foi classificado como latossolo vermelho-amarelo, textura arenosa, com as seguintes características físicas e químicas: pH (H₂O) 5,4; capacidade de troca catiônica 19,4 mmolc dm⁻³; matéria orgânica 9,3 g dm⁻³; argila 142,1 g kg⁻¹, areia 765,1 g kg⁻¹ e silte 82,7 g kg⁻¹.

Em laboratório o solo foi colocado em caixas plásticas brancas, sem drenagem, com capacidade para 4 kg, as quais constituíram as unidades experimentais. A umidade do solo foi corrigida para 60-70% da capacidade de campo e mantida constante até o final do período experimental, por meio de pesagens periódicas. Após um período de repouso de sete dias, os solos foram suplementados com o fungicida metalaxil (0; 3 e 30 µg g⁻¹ de solo), aplicado com um volume de água suficiente para manter a umidade do solo em 60-70% da capacidade de campo. Solos sem adição de fungicida foram utilizados para o controle. As avaliações dos cinco parâmetros microbiológicos ocorreram após 0, 7, 14, 21, 42 e 119 dias de incubação. A temperatura do solo também foi monitorada, tendo permanecido entre 23 a 28°C durante o período.

O efeito dos fungicidas sobre a microbiota do solo foi avaliado pelos parâmetros carbono da biomassa microbiana (Cmic); comprimento de hifa viva, atividade hidrolítica do diacetato de fluoresceína (FDA) e atividades enzimáticas da desidrogenase e fosfatase ácida.

Na avaliação do Cmic foi utilizado o método de extração-fumigação (VANCE et al., 1987). Os resultados obtidos para este parâmetro (Fig. 2.1) não demonstraram interação significativa entre tempo*tratamento, no entanto, o Cmic foi significativamente afetado pelo período de incubação (P<0,01%). Observou-se que, apesar do efeito negativo do metalaxil sobre este parâmetro estar presente desde o início das avaliações, ele somente foi significativo a partir do 28º dia. Quando comparado à testemunha, o tratamento com suplementação de 3 µg g⁻¹ apresentou inibição de 78% e 52% enquanto que na concentração mais alta (30 µg g⁻¹) esta inibição foi de 45% e 67% aos 28 e 42 dias respectivamente. Posteriormente houve recuperação da microbiota, apresentando no final do período experimental (119 dias) um incremento de 41 e 81% em relação ao controle, para a menor e maior dose

respectivamente, demonstrando que provavelmente houve aporte de nutrientes ou C, provenientes dos microrganismos afetados pelo fungicida.

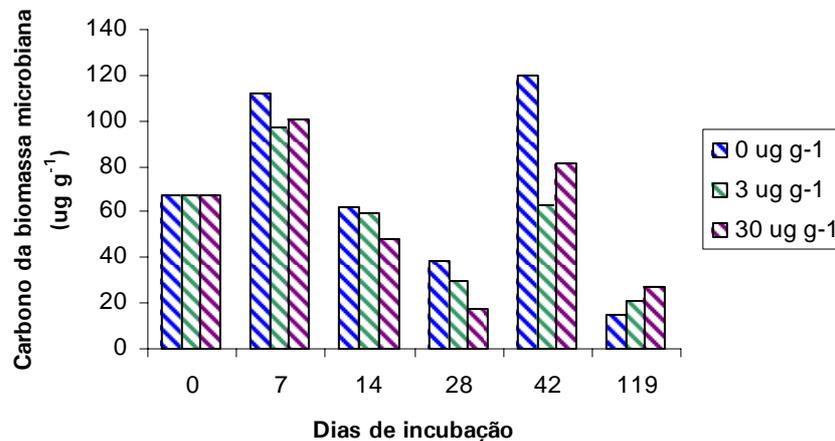


Fig. 2.1. Carbono da biomassa microbiana (C_{mic}) em $\mu\text{g g}^{-1}$ em solos coletados em Petrolina, PE, e suplementados em laboratório com diferentes concentrações de metalaxil (0; 3 e 30 $\mu\text{g g}^{-1}$ de solo). Média de três repetições.

Apesar de NANNIPIERI et al. (1990) observarem que no caso de ecossistemas complexos como os das regiões áridas e semi-áridas, as medidas de parâmetros como a biomassa microbiana ser problemática devido ao desequilíbrio natural destas áreas, GARCIA et al. (1994 e 1997) utilizaram este parâmetro como indicador da atividade microbológica de solos áridos do Mediterrâneo. Os autores observaram que em solos áridos o C_{mic} pode ser um indicador sensível das modificações no conteúdo de matéria orgânica quando relacionadas às atividades microbianas.

Neste estudo, realizado em laboratório, com solos da região semi-árida do Brasil, foi observado que o efeito negativo sobre este parâmetro pode estar relacionado principalmente ao efeito sobre a comunidade fúngica, como demonstra a correlação significativa ($P < 0,01\%$) entre o C_{mic} e a comprimento de hifa viva.

Comprimento de hifa viva: água sob pressão foi adicionada a 20 g de solo contidos em um becker de 500 mL. A suspensão foi vertida em peneiras de 0,71 e 0,25 mm, 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 10 segundos a baixa velocidade, para garantir a dispersão dos agregados; a mistura permaneceu em repouso por 2 min antes de ser lentamente vertida em uma peneira de 44 mesh. O material retido nesta peneira foi suspenso em tampão fosfato (pH 7,4; KH_2PO_4 0,1 M + NaOH 0,1 M; 10 mL). Para determinação do comprimento de hifas vivas, 5 mL dessa suspensão foi misturada com 5 mL da solução de diacetato de fluoresceína (FDA) (BLOEM et al., 1995). O FDA (5 mg) foi dissolvido em 2 mL de acetona (NOGUEIRA & CARDOSO, 2000). Após incubação a temperatura ambiente por 5 min as hifas foram colhidas por filtração em um filtro Millipore quadriculado (0,45 μm). 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).

$$R = (\pi \cdot A \cdot n) / 2 \cdot H \quad [1]$$

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 do `gride` reticulado da ocular; H é o comprimento total das linhas horizontais do *gride*.

De acordo com MONKIEDJE et al. (2002) a aplicação de metalaxil e mefenoxam aumentou a comunidade bacteriana do solo, provavelmente por ser fonte de C para alguns grupos de bactérias ou por causar a liberação de outras fontes de nutrientes. Em solos da região sudeste do Brasil, MORETINI (2000) observou o mesmo efeito do metalaxil sobre a comunidade bacteriana. Segundo DROBY & COFFEY (1991), as bactérias não são afetadas pela aplicação deste fungicida, mas podem ser as responsáveis pelo desaparecimento da molécula no solo. Os mesmos autores relatam que o metalaxil atinge outras classes de fungos além daqueles para os quais foi sintetizado, o que é preocupante do ponto de vista ambiental. Por outro lado, os resultados evidenciam que o efeito do fungicida foi transitório.

A estimativa da biomassa fúngica, baseada no comprimento de hifa viva, variou de 0,16 a 2,62 m g^{-1} solo seco (Fig. 2.2). Apesar de não significativo, o efeito negativo do fungicida metalaxil sobre este parâmetro foi observado logo aos 7 dias de incubação, com inibição de 39 e 53% para a menor e maior dose aplicada, respectivamente, quando comparado ao tratamento testemunha. Da mesma forma que para o Cmic, aos 28 dias, esta inibição alcançou patamares de 33% na menor dose, enquanto que para a

maior dose a inibição foi de apenas 12%. Posteriormente houve recuperação da biota fúngica.

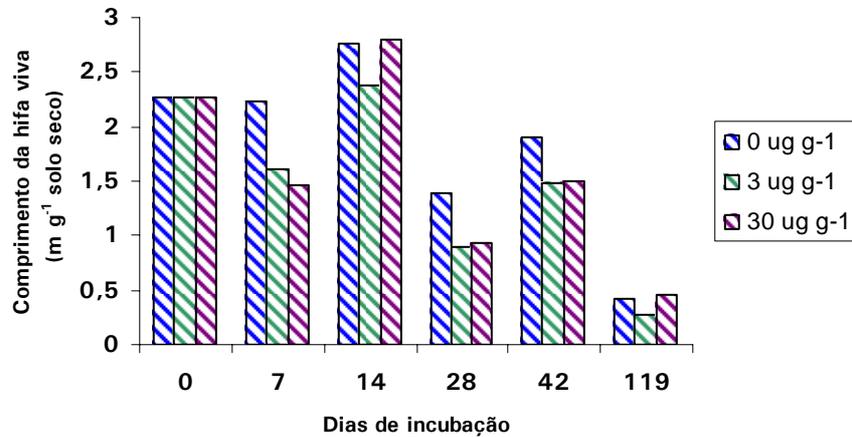


Fig. 2.2. Comprimento da hifa viva (m g^{-1} solo seco) em solos coletados em Petrolina, PE, e suplementados em laboratório com diferentes concentrações de metalaxil (0; 3 e 30 $\mu\text{g g}^{-1}$ de solo). Média de três repetições.

Tanto pelo parâmetro da biomassa microbiana quanto do comprimento de hifa viva pode-se observar que houve recuperação da comunidade microbiana no final do período experimental. Isso pode ter sido conseqüência da recuperação da microbiota original, ou que provavelmente houve aumento da população e atividade das poucas espécies microbianas resistentes ou ainda perda da competição pelos fungos inibidos pelo fungicida, ou ainda da direta utilização do fungicida como fonte de carbono (VYAS, 1988; CHEN et al., 2001). Trabalhos realizados com outros fungicidas (CHEN et al., 2001) demonstram efeitos diferenciados para o benomil, captan e clorotalonil em resposta à respiração do solo e suplementação orgânica. Os solos suplementados com os fungicidas apresentaram sempre uma biomassa microbiana menor quando comparada aos solos sem suplementação. Os resultados deste trabalho, quando comparados aos de CHEN et al. (2001), corroboram o postulado dos autores que enfatizam que o efeito dos fungicidas na atividade microbiana do solo está na dependência do tipo e modo de ação do composto em estudo.

As atividades enzimáticas dos solos também têm sido relatadas como potenciais indicadores de impactos negativos sobre o solo (DICK, 1992; BEYER et al.,

1992; GARCIA et al., 1998; BROHON et al., 2001; SANNINO & GIANFREDA, 2001; QUILCAÑO & MARAÑÓN, 2002). As esterases, lipases e proteases que hidrolisam o diacetato de fluoresceína (FDA) são abundantes no solo e a capacidade de hidrolisar FDA é generalizada entre os fungos e bactérias. A quantificação desta hidrólise fornece uma boa estimativa da atividade microbiana total.

Determinação da hidrólise de FDA: foi utilizada a metodologia descrita por Boehm & Hoitink (1992). Amostras de 5 gramas de substrato de cada vaso foram colocadas em frascos de 250 mL, juntamente com 20 mL de tampão fosfato de potássio 60 mM (8,7 g de K_2HPO_4 e 1,3 g de KH_2PO_4 L⁻¹ de água destilada; pH 7,6). A reação de hidrólise de FDA (Sigma Chemical Co.) foi iniciada adicionando-se 0,2 mL (400 µg) de solução estoque de FDA (2 mg mL⁻¹ de acetona). As amostras foram incubadas por 20 minutos em agitador a 160 rpm a 25°C. Imediatamente após a retirada das amostras do agitador, a reação foi interrompida por meio da adição de 20 mL de acetona por frasco. A seguir, foi feita a filtração em papel de filtro tipo Whatman nº 1, sendo os filtrados recolhidos em tubos de cultura. Logo após, em espectrofotômetro foi determinada a absorbância dos filtrados a 490 nm. Para obter a quantidade de FDA hidrolizado foi determinada uma curva padrão, adicionando-se em tubos de ensaio com rosca, 5 mL de tampão fosfato e 0, 100, 200, 300 e 400 µL de solução estoque de FDA, em duas repetições, para cada concentração, por tratamento. Posteriormente, para hidrolisar o FDA, os tubos foram tampados e submetidos em banho-maria com água fervente por uma hora. Após o resfriamento dos tubos, a solução de FDA hidrolizado foi colocada em frascos de 250 mL contendo 5 g do substrato e 15 mL de tampão fosfato, em duas repetições para cada tratamento. Seguiu-se a mesma metodologia descrita para a incubação, filtração e leitura de absorbância das amostras. Com a equação da reta da curva padrão obtida pela regressão linear entre o FDA hidrolizado e a absorbância, foi calculado o FDA hidrolizado pelos microrganismos nos respectivos tratamentos, expressos em µg min⁻¹ g solo seco⁻¹.

Neste trabalho foi observado um incremento na hidrólise do FDA desde o início das avaliações. Considerando os solos suplementados com o fungicida metalaxil, quando comparados ao tratamento controle, o incremento observado aos 7 dias de incubação foi de 24% para a concentração de 3 µg g⁻¹ (Fig. 2.3). Para a maior concentração não houve efeito. Aos 28 dias, este efeito positivo foi significativo ($P < 0,01\%$), e proporcional à dose aplicada, chegando a patamares de 17 e 39% considerando a maior e menor dose, respectivamente.

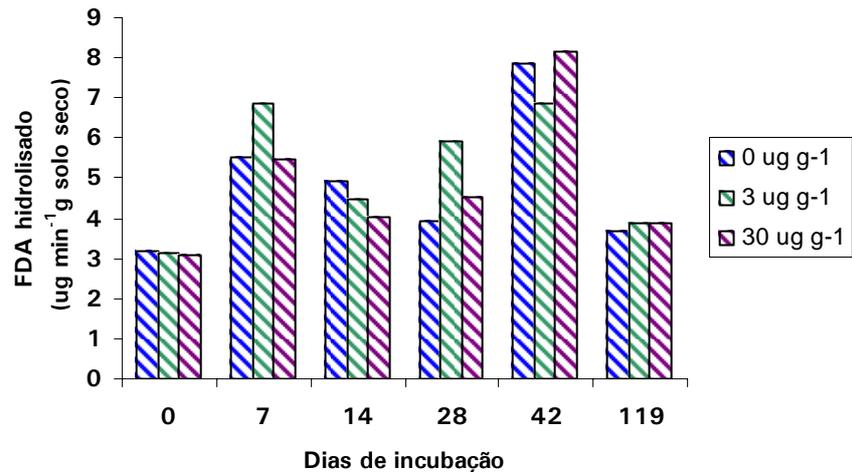


Fig. 2.3. Hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA, $\mu\text{g min}^{-1} \text{g solo seco}$) em solos coletados em Petrolina, PE, e suplementados em laboratório com diferentes concentrações de metalaxil (0; 3 e 30 $\mu\text{g g}^{-1}$ de solo). Média de três repetições.

A atividade hidrolítica do diacetato de fluoresceína apresentou correlação significativa ($P < 0,01\%$) com as atividades enzimáticas da fosfatase ácida e da desidrogenase.

Segundo SPESSOTO (2002), o metalaxil provocou mudanças na atividade total da microbiota em quatro solos avaliados, sendo três da região sudeste e um da região nordeste do Brasil. Para os dois períodos avaliados a microbiota presente no solo da região semi-árida do nordeste aumentou com a suplementação do solo, variando de 0,77 no início do experimento a 4,23 $\mu\text{g FDA hidrolisado g}^{-1}$ de solo seco min^{-1} ao final de 70 dias de incubação. No solo avaliado pelo presente trabalho, coincidentemente também solos da região semi-árida nordestina, esta atividade variou de 3,07 $\mu\text{g FDA hidrolisado g}^{-1}$ de solo seco min^{-1} no início do período de avaliação para 8,70 $\mu\text{g FDA hidrolisado g}^{-1}$ de solo seco min^{-1} aos 42 dias de incubação, considerando a suplementação com metalaxil na concentração de 30 $\mu\text{g g}^{-1}$ de solo. O pico estimulatório foi observado no 28º dia de incubação. Nos outros períodos de avaliação não foi detectado efeito significativo do fungicida nesta atividade. Pelos resultados pode-se inferir que o metalaxil pode ter estimulado a produção do complexo enzimático que hidrolisa FDA. Por outro lado, quando se utiliza acetona como solvente, como neste estudo, há um decréscimo substancial na absorvância da fluoresceína produzida pelas amostras do solo. Esta perda de cor é independente da concentração inicial da

fluoresceína, mas torna a quantificação da atividade hidrolítica do FDA muito difícil em solos com baixa atividade microbiana, como é o caso dos solos de regiões semi-áridas (ADAM & DUNCAM, 2001). Segundo SCHNÜER & ROSWALL (1982), quando a acetona foi utilizada, a medida do FDA em amostras de areia e argila foi muito baixa. Também, as enzimas que hidrolisam FDA são extracelulares e podem formar complexos estáveis com os colóides do solo, subestimando a sua quantificação.

A atividade enzimática da fosfatase também foi considerada por WICK et al. (2002) um indicador sensível da qualidade do solo. Em geral, a adição de fungicidas estimula a atividade dessa enzima (MONKIEDJE et al., 2002; NANNIPIERI, 1990).

Atividade enzimática da fosfatase ácida: a determinação seguiu o método descrito por Alef et al. (1995). Ao solo (1 g) foram adicionados tampão maleato 0,1 M (pH 6,5) e *p*-nitrofenil fosfato preparado na mesma solução tampão (1 mL). A mistura foi incubada a 37°C por 1 hora. Após a incubação foi adicionado CaCl₂ 0,5 M (1 mL) e NaOH 0,5 M (4 mL). O *p*-nitrofenol (PNP) formado foi determinado em espectrofotômetro a 400 nm. Os resultados da atividade foram expressos como µg de *p*-nitrofenol liberado em 1 h g⁻¹ de solo.

O efeito positivo da suplementação do fungicida metalaxil sobre a atividade da fosfatase ácida só foi observado aos 7 e 28 dias de incubação (Fig. 2.4). O incremento, aos 7 dias, apesar de não significativo, foi de 24% em ambas as doses utilizadas e de 20 e 33% (P<0,01%) aos 28 dias, para a menor e maior dose, respectivamente.

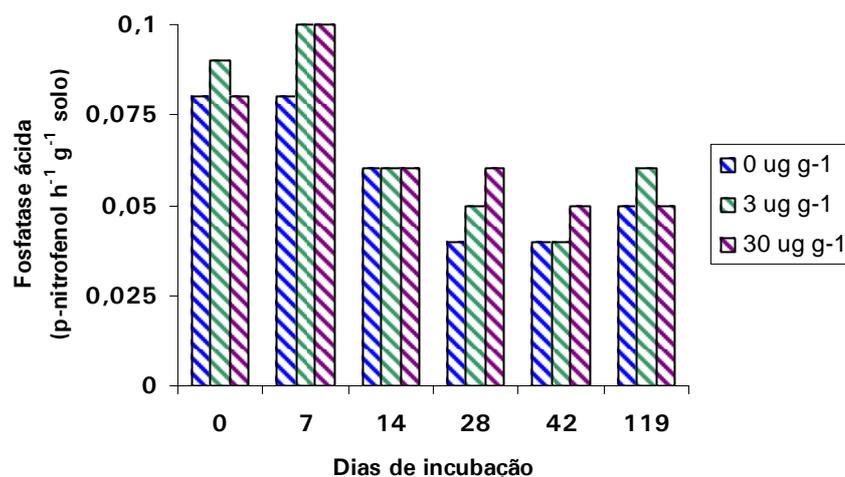


Fig. 2.4. Atividade enzimática da fosfatase ácida em solos coletados em Petrolina, PE, e suplementados em laboratório com diferentes concentrações de metalaxil (0; 3 e 30 µg g⁻¹ de solo). Média de três repetições.

Em estudos realizados em dois tipos de solo, arenosos e argilosos, foi verificado que tanto o mefenoxam quanto o metalaxil apresentaram efeito estimulatório sobre a atividade enzimática da fosfatase ácida, mesmo que a transitoriedade desta estimulação tenha sido menor para o metalaxil (MONKIEDJE et al., 2002). Ainda assim, os autores consideraram que de forma geral os fungicidas quando aplicados nas concentrações de 1 a 200 $\mu\text{g g}^{-1}$ de solo não afetaram a atividade enzimática da fosfatase.

As fosfatases são consideradas ectoenzimas, sendo que a fosfatase ácida é produzida tanto por microrganismos quanto pelas raízes das plantas. Sua atividade é influenciada tanto pela disponibilidade de P inorgânico quanto pela formação de agregados com os componentes do solo (NANNIPIERI, 1988). De acordo com CAMIÑA et al. (1998), as interações abióticas entre substratos e componentes do solo podem levar a uma superestimativa da atividade enzimática.

Segundo BURNS (1982) em solos de textura grossa como os das regiões áridas e semi-áridas, as atividades de enzimas livres na solução do solo são praticamente negligenciáveis. Segundo o autor, em solos com alta porcentagem de areia e baixo conteúdo de matéria orgânica, como é o caso do solo em estudo, a atividade enzimática depende geralmente de enzimas intracelulares como, por exemplo, a atividade da desidrogenase. Essa atividade enzimática é considerada um indicador do metabolismo oxidativo dos solos e assim da atividade microbiana (SKUJINS, 1973), e tem sido usada como indicador da atividade microbiológica tanto em solos áridos do Mediterrâneo (GARCIA et al., 1994) como em solos agrícolas de regiões mais úmidas (BEYER et al., 1992). MALKOME (1987) citado por DICK (1992) recomenda a atividade da desidrogenase em testes de rotina com pesticidas, uma vez que esta atividade permite determinar com sensibilidade a atividade microbiana dentro de 1 a 2 dias, em experimentos de laboratório. De forma geral esta atividade geralmente é inibida na presença de fungicidas.

Atividade enzimática da desidrogenase: a atividade enzimática da desidrogenase no solo foi avaliada segundo a técnica descrita por Alef (1995). Foram pesados 5 g de solo, com a umidade proveniente de campo, em tubos testes e misturados com 5 mL da solução de cloreto de trifênil tetrazólio (TTC) a 0,3%. Os tubos foram selados e incubados no escuro por 24 h a 37°C. Os tubos controles continham somente 5 mL de tampão Tris-HCl 100 mM, sem o TTC. Decorrido o período de incubação, 20 mL de metanol foram adicionados aos tubos, que foram agitados por 1 min e, posteriormente, centrifugados a 2000 rpm por 10 min. O trifênil formazan (TTF), formado pela redução do TTC, foi medido espectofotometricamente a 485 nm contra o branco.

Pelos resultados apresentados na Fig. 2.5, pode-se observar que não houve inibição na atividade da desidrogenase em todos os tratamentos até o 7° dia de incubação. No entanto, a partir do 14° dia foi observado incremento nesta atividade nos solos suplementados com o fungicida. Para ambas as doses do metalaxil, o maior aumento foi de 35%. Do 42° dia em diante, houve inibição significativa ($P < 0,01\%$) desta atividade, chegando a 27 e 46%, para as doses 1 e 2 do metalaxil, respectivamente. No final do período experimental, os resultados não apresentaram diferenças significativas, demonstrando recuperação desta atividade, provavelmente associada a recuperação da microbiota como evidenciado pelo Cmic.

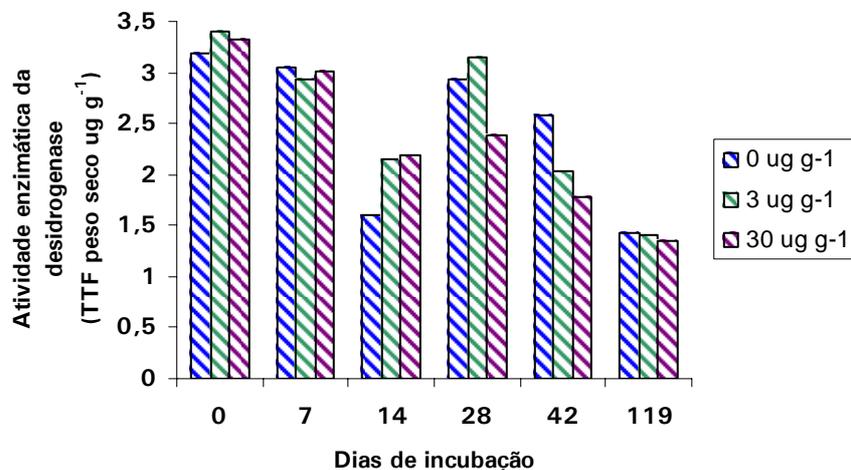


Fig. 2.5. Atividade enzimática da desidrogenase ($\mu\text{g g}^{-1}$) em solos coletados em Petrolina, PE, e suplementados em laboratório com diferentes concentrações de metalaxil (0; 3 e 30 $\mu\text{g g}^{-1}$ de solo). Média de três repetições.

Resultados semelhantes já foram obtidos por MONKIEDJE et al. (2002). Segundo os autores os fungicidas metalaxil e mefenoxam inibiram severamente a atividade da desidrogenase durante todo o período experimental, seguindo o modelo dose-resposta. Neste estudo, com solos da região semi-árida brasileira, esta atividade foi inibida pelos fungicidas metalaxil e fenarimol nos primeiros sete dias de incubação, quando comparada ao solo testemunha, voltando a apresentar um pico de recuperação aos 28 dias. Posteriormente ela voltou a declinar provavelmente devido a depleção de nutrientes uma vez que esta atividade correlaciona-se positivamente com o teor de

matéria orgânica do solo (WLODARCZYK et al., 2002). Nossos resultados também estão de acordo com os obtidos por MORETINI (2000), para os solos da região sudeste do Brasil. O autor observou que a inibição pelo metalaxil sobre a atividade enzimática da desidrogenase ocorreu dentro dos sete primeiros dias, recuperando-se a seguir, comprovando mais uma vez a sensibilidade desta atividade em detectar em curto prazo um efeito negativo sobre a microbiota do solo. A aplicação de outros fungicidas como, por exemplo, o benomil e clorotalonil estimularam a atividade da desidrogenase (18-21% e 8-15%, respectivamente), enquanto que captan inibiu esta atividade em 40-58% (CHEN et al., 2001), demonstrando que os efeitos são específicos para cada fungicida.

Conclusão

Parâmetros microbiológicos como C da biomassa microbiana, comprimento de hifa viva e atividade da desidrogenase podem ser considerados indicadores sensíveis do efeito adverso do metalaxil na microbiota do solo da região semi-árida. Em relação à atividade enzimática da fosfatase o metalaxil não apresentou efeito sobre os microrganismos, assim como sobre o FDA. Foi observado que o efeito do fungicida sobre todos os parâmetros foi transitório no solo.

Referências

- ADAM, G.; DUNCAN, H. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 33, p. 943-951, 2001.
- ALEF, K. Dehydrogenase activity. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (Ed.). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. London: Academic Press, 1995. p. 228-231.
- ALEF, K.; NANNIPIERI, P.; TRAZAR-CEPEDA. Phosphatase activity. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (Ed.). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. London: Academic Press, 1995. p. 335-344.

- BEYER, L.; WACHENDORF, C.; BALZER, F.M.; BALZER-GRAF, U.R. The effect of soil texture and soil management on microbial biomass and soil enzyme activities in arable soils of Northwest Germany. *Agrobiological Research*, v. 45, p. 276-283, 1992.
- 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.
- BOEHM, M.J.; HOITINK, H. A.J. Sustenance of microbial activity in potting mixes and its impact of severity of *Phytophthora* root rot of *Poinsettia*. *Phytopathology*, v. 82, p. 259-264, 1992.
- BROHON, B.; DELOLME, C.; GOURDON, R. Complementarity of bioassays and microbial activity measurements for the evaluation of hydrocarbon-contaminated soils quality. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 33, p. 883-891, 2001.
- BURNS, R.G. Enzyme activity in soil: location and a possible role in microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 14, p. 423-427, 1982.
- CAMIÑA, F.; TRASAR-CEPEDA, C.; GIL-SOTRES, F.; LEIRÓS, C. Measurement of dehydrogenase activity in acid soils rich in organic matter. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 30, p. 1005-1011, 1998.
- CHEN, S.-K.; EDWARDS, C.A.; SUBLER, S. Effects of the fungicides benomyl, captan and chlorothalonil on soil microbial activity and nitrogen dynamics in laboratory incubations. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 33, p. 1971-1980, 2001.
- DICK, R.P. A review: long-term effects of agricultural systems on soil biochemical and microbial parameters. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v. 40, p. 25-36, 1992.
- DROBY, S.; COFFEY, M.D. Biodegradation process and nature of metabolism of metalaxyl in soil. *Annals of Applied Biology*, v. 118, p. 543-553, 1991.
- GARCIA, C.; HÉRNANDEZ, T.; COSTA, F. Microbial activity in soils under Mediterranean environmental conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 26, p. 1185-1191, 1994.
- GARCIA, C.; HÉRNANDEZ, T.; COSTA, F. Potential use of dehydrogenase activity as an index of microbial activity in degraded soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, v. 1-2, p. 123-134, 1997.
- GARCIA, C.; HÉRNANDEZ, T.; ALBALADEJO, J.; CASTILLO, V.; ROLDAN, A. Revegetation in semiarid zones: influence of terracing and organic refuse on microbial activity. *Soil Science Society of America Journal*, v. 62, p. 670-676, 1998.
- MONKIEDJE, A.; ILORI, M. O.; SPITELLER, M. Soil quality changes resulting from the application of the fungicides mefenoxam and metalaxil to a sandy loam soil. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 34, p. 1939-1948, 2002.

- MORETINI, A. *Impacto do fungicida metalaxil sobre a microbiota e atividade enzimática do solo*. 2000. 93p. Dissertação (Mestrado) Universidade de São Paulo, São Paulo.
- NANNIPIERI, P.; GRECCO, S.; CECCANTI, B. Ecological significance of the biological activity in soil. In: BOLLAG, J.M., STOTZKI, G. (Ed.) *Soil Biochemistry*. New York: Marcel Dekker, 1990. v. 6, p. 293-355.
- NANNIPIERI, P.; CECCANTI, B.; BIANCHI, D. Characterization of humus-phosphatase complexes extrated from soil. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 20, p. 683-691, 1988.
- NEWMAN, E.I. A method for estimating the total length of root in a sample. *Journal of Applied Ecology*, v.3, p. 139-45, 1966.
- 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.
- PASCUAL, J. A.; GARCIA, C.; HERNANDEZ, T.; MORENO, J.L.; ROS, M. Soil microbial activity as a biomarker of degradation and remediation process. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 32, p. 1877-1883, 2000.
- QUILCANO, C.; MARAÑÓN, T. Dehydrogenase activity in Mediterranean forest soils. *Biology and Fertility of Soils*, v. 35, p. 102-107, 2002.
- SANNINO, F.; GIANFREDA, L. Pesticide influence on soil enzymatic activities. *Chemosphere*, v. 45, p. 417-425, 2001.
- SCHNÜNER, J.; ROSSWALL, T. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 43, p. 1256-1261, 1982.
- SKUJINS, J. Dehydrogenase: an indicator of biological activities in arid soils. *Bulletin of Ecological Research Communications*, Stockholm, v. 17, p. 235-241, 1973.
- SPESSOTO, A.M. *Dissipação do fungicida metalaxil em solos brasileiros e caracterização genética por RAPD de isolados envolvidos no processo*. 2002. 93p. tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2002.
- VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry*, v.19, p. 703-707, 1987.
- VYAS, S.C. *Nontarget effects of agricultural fungicides*. Boca Raton: CRC Press, 1988. p. 258-268.
- WEETE, J. D. Structure and function of sterols in fungi. *Advances in Lipid Research*, v. 23, p. 115-167, 1989.
- WICK, B.; KÜHNE, R.F.; VIELHAUER, K.; VLEK, P.L.G. Temporal variability of selected soil microbiological and biochemical indicators under different soil quality conditions in south-western Nigeria. *Biology and Fertility of Soils*, v. 35, p. 155-167, 2002.

WŁODARCZYK, T.; STEPNIEWSKI, W.; BRZEZIŃSKA, M. Dehydrogenase activity, redox potential, and emissions of carbon dioxide and nitrous dioxide from cambisols under flooding conditions. *Biology and Fertility of Soils*, v. 36, p. 200-206, 2002.