

## ISOLAMENTO DE FUNGOS DEGRADADORES DE CARBENDAZIM<sup>1</sup>

CÉLIA MARIA MAGANHOTTO DE SOUZA SILVA<sup>2</sup>, ITAMAR SOARES DE MELO<sup>3</sup>,  
ALINE DE HOLANDA NUNES MAIA<sup>4</sup> e ROSANGELA BLOTTA ABAKERLI<sup>5</sup>

**RESUMO** - Os fungicidas sistêmicos do grupo dos benzimidazóis são amplamente utilizados no controle de muitas doenças de plantas, tanto no solo como na parte aérea, e isso tem sido causa de contaminação ambiental. A ação de alguns microorganismos contribui para degradação e perda da atividade biológica desses fungicidas, podendo reduzir, dessa forma, o risco de impactos negativos. O objetivo deste trabalho foi selecionar fungos com potencial para degradar benomil e seu produto de hidrólise, carbendazim, e quantificar o potencial de degradação. Fungos foram isolados de três diferentes solos da região de agricultura irrigada do município de Guaíra, SP, com histórico de aplicação intensiva de fungicidas benzimidazóis. Dentre os fungos isolados, *Alternaria alternata* foi a linhagem menos afetada pelo aumento na concentração de benomil no meio de cultura. Na concentração máxima (100 µg mL<sup>-1</sup>) a inibição da taxa de crescimento de *A. alternata* foi 22%, enquanto nas demais linhagens foi superior a 45%. Em meio de cultura líquido suplementado com carbendazim, a taxa de crescimento em biomassa de *A. alternata* foi 43% maior do que a no meio sem carbendazim, o que indica o consumo do fungicida como fonte de carbono. *A. alternata* degradou rapidamente o fungicida, chegando a 66,21% de desaparecimento do produto em dois dias. A meia-vida de carbendazim nessas condições foi de 1,16 dias.

Termos para indexação: degradação, *Alternaria alternata*, benzimidazóis, benomil.

### ISOLATION OF CARBENDAZIM DEGRADING FUNGI

**ABSTRACT** - The systemic fungicides belonging to the benzimidazoles group are widely used in agricultural practice and its indiscriminate use has been cause of environmental contamination. The dissipation and the loss of the pesticide biological activity depends, most of the time, on the microorganisms action. The present research was carried out with the objective to select fungi with potential to degrades benomyl and its hydrolysis product, carbendazim, and to quantify its degradation potential. The fungi were isolated from three different kinds of soils collected in the region of the irrigated agriculture of Guaíra, SP, Brazil, with intensive use of fungicides. Among the analyzed fungi, *Alternaria alternata* had the growth rate less affected by increasing the benomyl concentration. Under the maximum concentration, the inhibition for *A. alternata* was 22%; for the other ones it was superior to 45%. In a liquid culture medium, enriched with carbendazim, the biomass growth rate for *A. alternata* was 43% superior to growth rate observed in the culture media without carbendazim. *A. alternata* soon degraded the fungicide, reaching 66.21% of the disappearance of the product in two days. The half-life of carbendazim in this study was of 1.16 days.

Index terms: degradation, *Alternaria alternata*, benzimidazoles, benomyl.

### INTRODUÇÃO

A introdução de fungicidas sistêmicos do grupo dos benzimidazóis, que são eficientes no controle das principais doenças de plantas, tornou-se um marco importante na história do desenvolvimento de fungicidas. Destes, 50% dos produtos comercializados correspondem ao benomil, 20% ao

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 29 de setembro de 1998.

<sup>2</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação do Impacto Ambiental (CNPMA), Rodovia SP-340, Km 127,5, Caixa Postal 69, CEP 13820-000 Jaguariúna, SP. E-mail: celia@cnpmma.embrapa.br

<sup>3</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa-CNPMA.

<sup>4</sup> Estatística, M.Sc., Embrapa-CNPMA.

<sup>5</sup> Química, Ph.D., Embrapa-CNPMA.

carbendazim e 20% aos demais componentes do grupo (Picinini, 1994). Os benzimidazóis são utilizados no tratamento de sementes, tratamento de solos, e em aplicações foliares. São caracterizados por uma alta seletividade, agindo em poucos processos do metabolismo dos patógenos.

A dissipação dos pesticidas no solo depende tanto da sua natureza como das condições bióticas e abióticas do solo. A dissipação e a perda da atividade biológica de uma ampla variedade de agrotóxicos devem-se, em grande parte, à degradação microbiana (Alexander, 1981). Os estudos sobre a persistência desses fungicidas no ambiente apresentam resultados altamente variáveis, porém a permanência deles no ambiente é bastante prolongada, e pode causar contaminação ambiental.

A primeira alusão à degradação microbiana do fungicida benomil foi mencionada a partir de estudos onde foi observada uma rápida perda do fungicida no solo, a qual não poderia ser atribuída à lixiviação ou absorção pela planta. Em laboratório, foi observada uma rápida perda do produto, quando os solos eram previamente tratados com benomil ou carbendazim. Em solos que não foram previamente tratados com benomil, não houve perdas do fungicida (Woodcock, 1978). Com relação à persistência e degradação de benomil, Rajagopal et al. (1984) propuseram um caminho para a degradação de benomil em solo e em culturas microbianas (Fig. 1).

Uma das características das populações microbianas é a capacidade de adaptação à presença de compostos químicos no ambiente, através de mutação, indução ou inibição seletiva de um ou mais membros da comunidade. Alguns casos de adaptações microbianas a pesticidas, foram citados por Moorman (1994). Essas populações adaptadas podem degradar mais rapidamente os pesticidas nas aplicações seguintes. Tal fenômeno foi primeiramente observado na década de 40 (Camper, 1991). Outros autores como Entwistle (1983), Yarden et al. (1985) e Somasundaram & Coats (1990), também registraram esse fato.

O conhecimento sobre a degradação de fungicidas por populações microbianas é importante componente na avaliação do impacto da aplicação de fungicidas no ambiente.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de isolar e selecionar linhagens de fungo com potencial para degradar carbendazim, e quantificar o potencial de degradação das linhagens selecionadas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Isolamento e seleção de fungos em meio suplementado com benomil

Avaliaram-se três diferentes tipos de solos provenientes de áreas de agricultura irrigada do município de Guaíra, SP, onde é prática comum o uso intensivo de pesticidas. 50  $\mu\text{g g}^{-1}$  de benomil foram adicionados às amostras de solo, em laboratório. Essas amostras foram reumedecidas e estocadas em condições ambientais normais. Em cada tipo de solo foi avaliado um controle correspondente a amostras de solo não tratado com o fungicida.

As subamostras (1 g) de solo seco ao ar foram suspensas em 9 mL de solução salina esterilizada, e agitadas durante duas horas. Após esse período, foram realizadas diluições

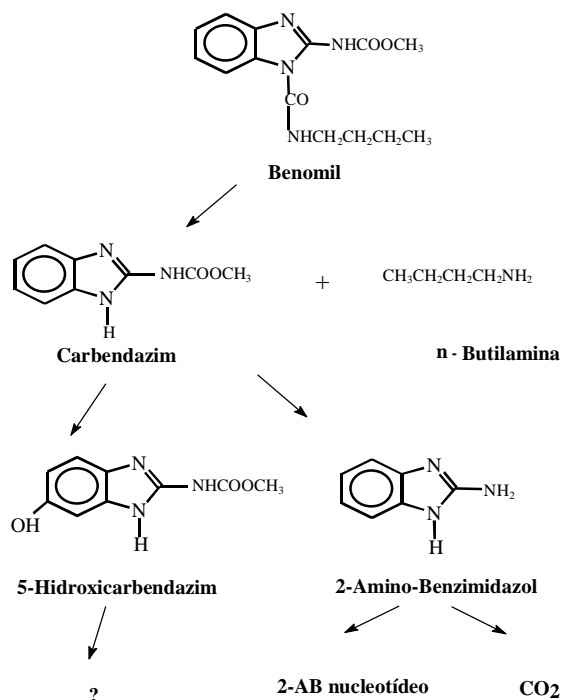


FIG. 1. Rota de degradação do benomil em solo e em culturas microbianas (Rajagopal et al., 1984)

em série. Para as diluições  $10^3$  e  $10^4$ , foram retiradas amostras (0,1 mL) e semeadas em placas-de-petri contendo meio mínimo de Pontecorvo (Pontecorvo et al., 1953) suplementado com  $50 \mu\text{g g}^{-1}$  de benomil como fator seletivo, com cinco repetições. As culturas foram incubadas no escuro, a  $28^\circ\text{C}$ , por sete dias. Foram contadas as colônias desenvolvidas.

#### Crescimento micelial das linhagens selecionadas em meio suplementado com benomil

Entre os microrganismos que desenvolveram colônias, foram selecionadas treze linhagens de fungos, as quais foram repicadas para placas-de-petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), suplementado com diferentes concentrações de benomil: 0, 10, 20, 50 e  $100 \mu\text{g g}^{-1}$ . Foi utilizado o delineamento experimental completamente casualizado, com três repetições. Os tratamentos foram constituídos das combinações dos fatores linhagem e concentração, arranjos em esquema fatorial  $13 \times 5$ . O desenvolvimento das colônias foi avaliado nos três primeiros dias, registrando-se, nessas datas, o diâmetro da colônia, em cada placa.

Taxas médias de crescimento micelial foram calculadas em cada linhagem, nos meios com as diferentes concentrações de benomil. Foram calculadas taxas de crescimento relativas, em cada linhagem, nas várias concentrações, expressando a taxa de crescimento em cada concentração, como fração da respectiva taxa de crescimento no meio sem benomil; a inibição máxima do crescimento em cada linhagem foi estimada dividindo-se a variação entre a taxa de crescimento mínima e a taxa de crescimento na concentração zero, pela taxa de crescimento na concentração zero.

Foi feita análise de variância da inibição máxima. As médias das linhagens foram comparadas pelo teste de Tukey, utilizando o PROC GLM do SAS (SAS, 1989).

#### Degradação de carbendazim em laboratório

Para avaliar a capacidade do fungo selecionado, *Alternaria alternata*, em degradar o carbendazim (MBC), sem a participação de interferentes como partículas do solo, foi realizado ensaio onde o fungo foi cultivado em placas-de-petri em meio batata-dextrose (BD) - 50% suplementado com  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  de MBC (grau técnico-Hoechst) e incubado sob agitação em agitador orbital a  $28^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . A degradação do carbendazim nesse meio de cultura foi também quantificada sem a presença do fungo.

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com os fatores presença do fungo (sim ou não) e tempos de avaliação (2, 4, 7, 15 e 30 dias), arranjos em esquema fatorial. Para validação do método analítico, foram estabelecidas as porcentagens de recuperação dos resíduos de carbendazim. Estas foram determinadas em Erlenmeyers contendo meio de cultura BD (50%) suplementado com  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  de carbendazim. As culturas foram incubadas nas mesmas condições do experimento. As porcentagens de carbendazim remanescentes no tratamento com presença do fungo, nas datas de avaliação foram corrigidas pelas respectivas porcentagens de recuperação obtidas no controle.

A determinação quantitativa dos resíduos fungitóxicos, a partir do segundo dia, foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), usando uma coluna de troca catiônica (Shim pack WCX-1) e detecção por ultravioleta, após extração e purificação das amostras. As etapas deste processo seguiram a metodologia descrita por Silva (1996). Procedeu-se à análise cromatográfica nas seguintes condições: temperatura da coluna:  $40^\circ\text{C}$ ; fase móvel: fosfato de amônio  $0,0125 \text{ M}$ ; fluxo:  $0,2 \text{ mL min}^{-1}$  e detector de absorvância operando a  $280 \text{ nm}$ . Sob estas condições, os tempos de retenção do carbendazim e 2-aminobenzimidazol foram de, aproximadamente, 4,5 e 6,3 minutos, respectivamente. A recuperação de MBC do meio líquido variou de 70% a 84%. Os cálculos para a quantificação foram baseados em curvas de calibração obtidas para soluções de carbendazim em concentrações conhecidas.

Para estimar a meia-vida do produto e seu potencial máximo de degradação nas condições do experimento, foi ajustada uma curva de degradação. Espera-se que a quantidade de carbendazim remanescente (Q) decresça ao longo do tempo, até se estabilizar. Portanto, para descrever a degradação microbiana do carbendazim ao longo do tempo, foram propostos dois tipos de modelos não-lineares adequados, para descrever esse comportamento. Os modelos propostos são descritos a seguir.

1) Modelo segmentado

$$Q_i(t) = \begin{cases} 1 + \alpha.t + \beta.t^2 + \varepsilon_{it} \dots \text{se} \dots t < t_c \\ Q_c + \varepsilon_{it} \geq t_c \end{cases}$$

onde  $Q_i(t)$  é a porcentagem de carbendazim remanescente na repetição  $i$ , no tempo  $t$ ;  $\alpha$  a componente linear relacionada com a velocidade média de degradação;  $\beta$  a componente quadrática que mensura a aceleração da degradação;  $\varepsilon_{it}$  o erro aleatório associado a cada observação;  $Q_c$  a porcentagem de carbendazim remanescente após a estabilização, e  $t_c$  o instante a partir do qual a degradação microbiana cessa. Nesse modelo,  $t_c$  é definido como a

abscissa do vértice da parábola que representa a fase decrescente do modelo.

#### II) Modelo exponencial negativo complementar

Nesse modelo, a transição entre as fases decrescente e constante da curva de degradação ocorre de modo mais suave que no anterior. O modelo é dado por:

$$Q_i(t) = 1 - \alpha \cdot \exp(-\beta \cdot t) + \varepsilon_{it}; \alpha > 0; \beta > 0$$

onde  $\alpha$  é a degradação máxima atingida;  $\beta$  é um parâmetro relacionado com a velocidade da degradação na fase decrescente.  $Q_i(t)$  e  $\varepsilon_{it}$  são definidos do mesmo modo que no modelo I.

O modelo I foi ajustado pelo método de Gauss-Newton (Hartley, 1961), para minimização da soma de quadrados não-lineares, utilizando o PROC NLIN do SAS (SAS, 1989). No modelo II foi usado o método da secante ou DUD (Ralston & Jennrich, 1978).

O melhor modelo foi escolhido com base na precisão das estimativas da degradação nas datas de avaliação e na análise de resíduos, diferenças entre valores observados e preditos pelo modelo. Como medida da precisão das estimativas foi utilizada a metade da amplitude do intervalo de confiança de 95% para a estimativa expressa como porcentagem do valor da estimativa, denominada semi-amplitude relativa (SAR). A meia-vida ( $t_{50}$ ) e o potencial máximo de degradação ( $DEG_{max}$ ) foram estimados a partir do modelo selecionado. A meia-vida corresponde ao valor de  $t$ , para o qual o valor predito de  $Q(t)$  é igual a 0,50; o  $DEG_{max}$  (%) é dado por  $DEG_{max} = 1 - Q_{min}(t)$ , onde  $Q_{min}(t)$  é a quantidade de carbendazim remanescente quando a degradação cessa.

#### Estimativa do incremento em biomassa de *A. alternata*

A avaliação da biomassa microbiana ocorreu paralelamente ao experimento de degradabilidade, sob as mesmas condições de incubação. Foi realizado um ensaio com delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições. Os tratamentos constituíram-se de combinações dos fatores meio de cultura e tempos de avaliação. Os meios de cultura utilizados foram: (I) BD (50%) sem carbendazim e (II) BD (50%) suplementado com carbendazim ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Diariamente, durante uma semana, foram retiradas unidades experimentais para determinação da biomassa. A massa micelial foi seca em estufa a  $55^\circ\text{C}$ , até peso constante.

Para avaliar a variação da biomassa ao longo do tempo nos meios suplementados ou não com carbendazim,

foi ajustado um modelo polinomial cúbico. Esse modelo, dito modelo geral, pode ser representado por dois submodelos, correspondentes a cada um dos tratamentos, descritos a seguir:

$$Y_{ik}(t) = \theta + \alpha_k \cdot t + \beta_k \cdot t^2 + \gamma_k \cdot t^3 + \varepsilon_{ik}$$

onde  $Y_{ik}(t)$  é a biomassa micelial no instante  $t$  ( $t=1,2,3,4,5$  e  $6$ ) e tratamento  $k$  ( $k=1,2$ ),  $\theta$  é a biomassa no tempo zero, comum aos dois tratamentos,  $\alpha_k$ ,  $\beta_k$  e  $\gamma_k$  são as componentes linear, quadrática e cúbica, da curva de crescimento no tratamento  $k$ , e  $\varepsilon_{ik}$ , o erro aleatório associado a cada observação.

Foi avaliada a adequação de modelos com estrutura de covariância simples ou diagonal: a primeira, corresponde a variâncias iguais ao longo do tempo nos dois tratamentos; a segunda, corresponde a variâncias específicas para cada tempo e tratamento (Jennrich & Schulcher, 1986). O melhor modelo foi escolhido com base no teste da razão de verossimilhança (Silvey, 1978). Os parâmetros foram estimados pelo método de máxima verossimilhança, utilizando o PROC MIXED do SAS (SAS, 1989). As curvas de crescimento em biomassa nos dois meios de cultura foram comparadas por meio de contrastes entre os respectivos parâmetros, utilizando o teste F para contrastes.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Isolamento e seleção de fungos degradadores de benomil

Observou-se um comportamento diferenciado do solo testemunha em relação ao suplementado com benomil. Nas culturas-controle não houve desenvolvimento de colônias, enquanto nas culturas de solo suplementado com benomil como única fonte de carbono e energia, uma maior comunidade de microrganismos ( $6,4 \times 10^4/\text{g}$  de solo) entre bactérias, fungos e actinomicetos foi observada na amostra do solo 3, o que indica adaptação da comunidade microbiana para a utilização do fungicida. As amostras 1 e 2 apresentaram uma comunidade microbiana de  $3,3 \times 10^4$  e  $6,2 \times 10^4/\text{g}$  de solo, respectivamente. Considerando-se que as amostras de solo foram coletadas na mesma região geográfica, os resultados mostraram variações secundárias que determinaram a presença, ou não, de uma determinada atividade microbiológica.

Também a diferença na composição da biomassa microbiana do solo determinou a extensão do efeito do pesticida.

#### Crescimento micelial das linhagens selecionadas em meio suplementado com benomil

Das treze linhagens isoladas, apenas dez foram avaliadas quanto à inibição. Nas linhagens 5, 7 e 8 não foi possível calcular a taxa de crescimento relativa, em face da ocorrência de contaminação ou crescimento rápido na dose zero, quando a colônia atingiu bordas da placa antes do terceiro dia de avaliação.

Observou-se que todas as linhagens apresentaram inibição do crescimento na dose máxima, que variou entre 21% e 99% (Tabela 1). *Alternaria alternata* apresentou a menor inibição em meio suplementado com 100 µg mL<sup>-1</sup> de benomil (21,84%), ou seja, a taxa de crescimento micelial dessa linhagem no meio suplementado com 100 µg mL<sup>-1</sup> correspondeu a 79,16% da taxa de crescimento em meio não suplementado. Esse resultado indica que o fungo *A. alternata* apresenta maior potencial para degradar benomil em relação às demais linhagens avaliadas.

**TABELA 1. Inibição da taxa de crescimento micelial (%) na dose 100 µg g<sup>-1</sup> nas dez linhagens avaliadas, com respectivos erros-padrão (%)<sup>1</sup>.**

Linhagens fúngicas	Inibição (%)	Erro padrão da estimativa (%)
10	98,96a	9,61
3	98,23a	7,84
2	95,57a	7,84
9	95,20a	7,84
6	91,67a	13,58
11	83,09ab	9,61
4	80,00ab	9,61
1	64,94abc	9,61
12	46,28bc	7,84
13	21,84c	9,61

<sup>1</sup> 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 alterava as populações microbianas de solos tratados no campo com 2,2; 22,4 ou 89,6 kg ha<sup>-1</sup> do ingrediente ativo. Além disso, registrou também que fungos comuns do solo como *Penicillium*, *Aspergillus* e *Trichoderma*, apesar de serem sensíveis a culturas enriquecidas com benomil, crescem em populações normais, no campo, em solos tratados com benomil. Por outro lado, Siegel (1975) demonstrou que benomil adicionado ao solo, em estudos com 30-35 dias de duração, não causou modificações na população bacteriana, mas reduziu de 2 a 3 vezes o número de fungos e actinomicetos, porém nestes estudos não ocorreram modificações em grande escala (> 10 vezes), nas populações microbianas do solo. Hofer et al. (1971) e Sinhá et al. (1980) registraram o efeito tóxico de carbendazim acima de 20 µg mL<sup>-1</sup>, e o efeito fungistático do benomil acima de 25 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente, enquanto no presente estudo observou-se o efeito tóxico de carbendazim acima de 10 µg/g. Yarden et al. (1990), ao isolarem populações fúngicas de solos com e sem história de carbendazim, observaram que dois terços dos fungos isolados capazes de degradar carbendazim, foram identificados como *Alternaria alternata*. Além disso, Moubasher et al. (1984) verificaram que o benomil foi quase regularmente tóxico para os fungos do solo e raiz, e da superfície das folhas. De acordo com esses autores, a maioria dos fungos foram afetados em certos períodos e doses, porém *A. alternata* resistiu ao efeito do benomil na maioria dos tratamentos utilizados e, em alguns tratamentos teve até sua contagem aumentada. Outros autores reportam essa espécie como predominante em solos agrícolas tratados com benomil (Edgington et al., 1971). *A. alternata*, e todos os Porosporae não são inibidos pelos fungicidas do grupo dos benzimidazóis (Bollen & Fuchs, 1970) e podem ser considerados como potentes agentes de descontaminação ambiental, pois esses fungicidas são usados na agricultura, muitas vezes, indiscriminadamente.

#### Degradação de carbendazim em laboratório

Os resultados relativos ao ajuste dos modelos de degradação propostos são apresentados na Tabela 2. Observou-se que as estimativas da



**TABELA 2.** Degradação predita (%), limites inferior (LI) e superior (LS) dos intervalos de confiança de 95% e semi-amplitudes relativas (SAR) dos intervalos de confiança para os modelos I e II.

Dia	Degradação predita (%)	Intervalo de confiança de 95%		
		LI	LS	SAR
Modelo I				
1	43,67	37,53	49,81	14,06
2	70,87	64,32	77,42	9,24
4	81,80	77,48	86,12	5,28
15	81,80	77,48	86,12	5,28
30	81,80	77,48	86,12	5,28
Modelo II				
1	45,39	40,04	50,74	11,79
2	66,21	61,46	70,97	7,18
4	80,16	77,05	83,24	3,87
15	83,87	80,00	87,74	4,61
30	83,87	80,00	87,74	4,61

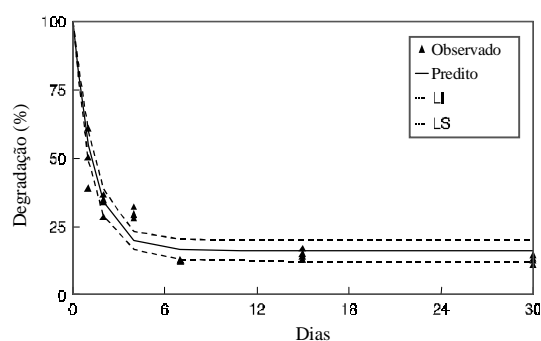
porcentagem de degradação ao longo do tempo são mais precisas do modelo II: as semi-amplitudes relativas dos intervalos de confiança da degradação predita no modelo II foram sempre inferiores às respectivas semi-amplitudes observadas no modelo I. A qualidade do ajuste avaliada pela análise de resíduos também indicou o modelo II como mais adequado; o modelo I subestima sistematicamente a degradação na fase de estabilização.

Desse modo, a quantidade de carbendazim estimada em cada instante  $t$  é dada pelo modelo:

$$Q_i(t) = 1 - \left[ 0,8387 \times \left( 1 - e^{-0,7791 \times t} \right) \right]$$

Considerando esse modelo (Fig. 2), a meia-vida estimada do carbendazim, nas condições do experimento, foi 1,16 dias. A degradação cessou a partir do sétimo dia quando a concentração de carbendazim no meio de cultura atingiu 16,13% da concentração inicial. Observou-se alta porcentagem de degradação (66,21%) já nos dois primeiros dias de incubação (Tabela 2), o que indica um rápido consumo de carbendazim por *Alternaria alternata*.

A degradação microbiológica dos pesticidas é um processo pelo qual os microrganismos adaptam-se



**FIG. 2.** Curva de degradação de carbendazim por *Alternaria alternata* com limites inferior (LI) e superior (LS) do intervalo de confiança de 95%.

ao pesticida e produzem enzimas capazes de degradá-lo durante a chamada “fase lag” de crescimento, 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 à degradação microbiana, sendo aplicado ao solo pela primeira vez, um período de adaptação é usualmente observado, antes que a degradação

ocorra a taxas significativas. A aplicação subsequente do mesmo pesticida resulta em uma degradação rápida e imediata com pequeno ou nenhum período de adaptação (Alexander, 1994).

À 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, conseqüentemente, a velocidade de degradação diminui proporcionalmente com a concentração do pesticida, de acordo com a cinética de primeira ordem.

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. 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. Outro trabalho demonstra a degradação de carbendazim por *Phanerochaete chrysosporium* (Silva et al., 1996). Kauffman 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. Esse fenômeno tem sido demonstrado em relação a vários pesticidas, entre eles o carbendazim (Yarden et al., 1987, 1990; Gupta & Sharma, 1989). 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.

Apesar de não haver nenhum relato sobre a taxa de degradação adequada para um determinado pesticida ou grupo de pesticidas, o uso de constantes de primeira ordem tem validade na descrição da degradação e, conseqüentemente, 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 graças à sua simplicidade de uso. Ela possibilita estimar a meia-vida, que é o tempo necessário para que haja dissipação de 50% do pesticida, independentemente da concentração inicial do solo.

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, 1987, citado por Johnson & Lavy, 1994), enquanto outros trabalhos registraram a meia-vida de 6 a 12 meses para o fungicida (Rajagopal et al., 1984). Austin & Briggs (1976), em estudos de campo, observaram que a redução 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. 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 depende do microrganismo, substrato, condições ambientais, pH, além da exposição prévia do microrganismo ao pesticida ou a compostos estruturalmente relacionados.

Neste trabalho, não foi observada a presença do metabólito 2-aminobenzimidazol, o que, provavelmente, se deve à rápida mineralização do produto. Segundo Aharonson et al. (1990), as aplicações

**TABELA 3. Recuperação de carbendazim (%) em meio de cultura (BD) suplementado com o fungicida, inoculado ou não com *Alternaria alternata*.**

Tratamentos <sup>1</sup>	Dias					
	1	2	4	7	15	30
M.C.+ MBC	70,45	75,21	72,86	71,78	70,25	70,93
M.C.+ MBC + <i>A. alternata</i>	55,52	33,55	29,84	14,85	19,21	13,70

<sup>1</sup> MBC = carbendazim; M.C. = meio de cultura.

repetidas de um mesmo pesticida pode também acelerar a degradação dos produtos formados. Eles exemplificam este fato, relatando que o 2-aminobenzimidazol foi rapidamente dissipado em solos que foram expostos a carbendazim, e afirmam que a degradação de 2-aminobenzimidazol foi mais rápida que a do seu parental MBC. Tal relato permite sugerir que neste trabalho a não detecção de resíduos de 2-aminobenzimidazol em culturas de *A. alternata*, pode ser devido à rápida mineralização, porém são necessários estudos posteriores com compostos radiomarcados para confirmar essa hipótese.

Na Tabela 3 são apresentados os resultados da recuperação de carbendazim aplicado nos tratamentos avaliados no experimento de biodegradabilidade.

#### Estimativa do incremento em biomassa de *A. alternata*

O fungo apresentou padrão de crescimento linear em ambos os tratamentos (Fig. 3). Não houve evidência suficiente de efeitos quadrático ou cúbico (Teste F,  $p > 0,23$ ). Considerou-se que a correlação entre as medidas de biomassa ao longo do tempo foi melhor descrita por uma estrutura de covariância simples que corresponde à hipótese de variâncias iguais. Essa hipótese não foi rejeitada pelo teste da razão de verossimilhança ( $p = 0,7605$ ). As estimativas dos parâmetros das curvas de crescimento e do contraste entre as taxas de incremento diário em biomassa são apresentadas na Tabela 4. Os incrementos diários médios em biomassa do fungo *A. alternata* em meio de cultura com e sem suplementação de carbendazim foram 5,54 e 3,81 mg dia<sup>-1</sup>, respectivamente. Verificou-se que no

meio com MBC o incremento médio foi superior (Teste t unilateral para contrastes,  $p = < 0,0001$ ) em 45,41% ao incremento no meio sem MBC, o que indica o consumo do fungicida MBC utilizado como fonte de carbono pelo fungo.

Desde o início do uso de pesticidas na agricultura houve uma grande preocupação sobre o efeito prejudicial dos pesticidas sobre a microbiota do solo. Durante a década de setenta, o desenvolvimento de métodos para estimar biomassa microbiana forneceu novos caminhos para medir o efeito dos pesticidas nesta microbiota. 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 mediante estudos *in vitro* pela transferência dos microrganismos para meios de cultura providos de fonte de C, N, P e

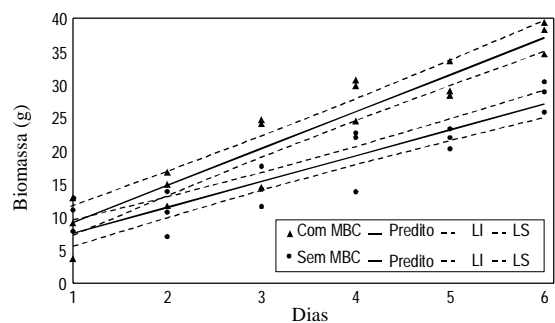


FIG. 3. Curvas de crescimento de *Alternaria alternata* em meio de cultura BD (50%), suplementado ou não, com carbendazim (MBC), com limites inferior (LI) e superior (LS) do intervalo de confiança de 95%.

TABELA 4. Estimativas de máxima verossimilhança do intercepto ( $\alpha$ ), dos incrementos médios em biomassa nos meios com ( $\beta_1$ ) e sem carbendazim ( $\beta_2$ ) e da diferença entre os incrementos nos dois meios com seus respectivos erros-padrão e probabilidades de erro-tipo I ( $p$ ) associadas aos testes t.

Parâmetro	Estimativa (mg/dia)	Erro-padrão (mg/dia)	Graus de liberdade	t	p
$\alpha$	4,10	1,25	33	3,29	0,0024
$\beta_1$	5,54	0,35	33	15,84	0,0001
$\beta_2$	3,81	0,35	33	10,89	0,0001
$\beta_1 - \beta_2$	1,73	0,28	33	6,17	0,0001



fatores de crescimento, temperatura e pH adequados a essa população microbiana, para que ela possa consumir os substratos e se reproduzir, aumentando, assim, com o tempo, a sua concentração, isto é, o número de células por unidade de volume do meio de cultura. 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.

### CONCLUSÕES

1. O método de suplementação do solo com benomil é eficiente para isolar fungos degradadores de carbendazim.

2. O fungo *A. alternata* apresenta um alto potencial para a degradação do fungicida carbendazim, apresentando meia-vida de 1,16 dia nas condições do experimento.

### REFERÊNCIAS

- AHARONSON, N.; KATAN, J.; AVIDOV, E.; YARDEN, O. The role of fungi and bacteria in the enhanced degradation of fungicide carbendazim and the herbicide diphenamid. In: RACKE, K.D.; COATS, J.R. (Eds.). **Enhanced biodegradation of pesticides in the environment**. Washington, DC: American Chemical Society, 1990. p.113-127.
- ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**. San Diego, CA: Academic Press, 1994. 301p.
- ALEXANDER, M. Biodegradation of chemicals of environmental concern. **Science**, v.211, p.132-138, 1981.
- 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, p.201-210, 1976.
- 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.
- CAMPER, N.D. Effects of pesticide degradation products in soil microflora. In: SOMASUNDARAM, L.; COATS, J.R. (Eds.). **Pesticide transformation products: fate and significance**. Washington, DC: American Chemical Society, 1991. p.205-216 (ACS Symposium Series, 459).
- EDGINGTON, L.V.; KHEW, K.L.; BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, v.61, n.1, p.42-44, 1971.
- ENTWISTLE, A.R. Changes in the effectiveness of iprodione for the control of allium white rot. **Phytopathology**, v.73, p.800-802, 1983.
- GUPTA, V.K.; SHARMA, S.D. Degradation of carbendazim in soil by microorganisms. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v.59, p.21-24, 1989.
- HARTLEY, H.O. The modified Gauss-Newton method for the fitting of nonlinear regression functions by least squares. **Technometrics**, v.3, p.269-280, 1961.
- HOFER, I.; BECK, T.; WALLINOFER, P. Effect of fungicide benomyl on the microflora of soil. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, v.78, p.399-405, 1971.
- JENNRICH, R.I.; SCHULCHER, M.D. Unbalanced repeated-measure models with structured covariance matrices. **Biometrics**, v.42, p.805-820, 1986.
- 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.
- KAUFFMAN, 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, 1985. p.437-451.
- LIU, L.X.; HSIANG, T. Bioassays for benomyl adsorption and persistence in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v.26, p.317-324, 1994.
- 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 Pub., 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. **Zentralblatt für Mikrobiologie**, v.139, p.281-291, 1984.

- PEEPLES, J.L. Microbial activity in benomyl treated soil. **Phytopathology**, v.64, p.857-860, 1974.
- PICININI, E.C. Fungicidas benzimidazóis. **Revisão Anual de Patologia Vegetal**, v.2, p.357-409, 1994.
- 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.
- 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, 1984.
- RALSTON, M.L.; JENNRICH, R.I. DUD, a derivative free algorithm for nonlinear least squares. **Technometrics**, v.20, p.7-14, 1978.
- SAS INSTITUTE Inc. **SAS/STAT user's guide**. Version 6, 4.ed. Cary, NC, 1989. p.1162-1165.
- SIEGEL, M.R. Benomyl-soil microbial interactions. **Phytopathology**, v.65, p.219-220, 1975.
- SILVA, C.M.M.S. **Biodegradação do fungicida carbendazim**. Rio Claro: UNESP, 1996. 86p. Tese de Doutorado.
- SILVA, C.M.M.S.; FAY, E.F.; MELO, I.S. Degradação do fungicida carbendazim por *Phanerochaete chrysosporium*. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, p.496-498, 1996.
- SILVEY, S.D. **Statistical inference**. London: Chapman and Hall, 1978. 192p.
- SINHÁ, A.P.; AGNIHOTRI, V.P.; SINGH, K. Effect of bavistin on soil microflora and their related physiological activity on growth of sugar beet seedlings. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.18, p.789-791, 1980.
- SOMASUNDARAM, L.; COATS, J.R. Influence of pesticide metabolites on the development of enhanced biodegradation. In: RACKE, K.D.; COATS, J.R. (Eds.). **Enhanced biodegradation of pesticides in the environment**. Washington, DC: American Chemical Society, 1990. p.128-140. (ACS Symposium Series, 426).
- WOODCOCK, D. Microbial degradation of fungicides, fumigantes and nematicides. In: HILL, I.; WRIGHT, S.J.L. (Eds.). **Pesticide Microbiology**. New York: Academic, 1978. p.731-780.
- YARDEN, O.; AHARONSON, N.; KATAN, J. Accelerated microbial degradation of methyl benzimidazol-2-ylcarbamate in soil and its control. **Soil Biology & 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 soils. **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.