



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

Departamento de Química

**DEGRADAÇÃO BIOLÓGICA DE
FUNGICIDAS EM AMOSTRAS DE SOLO
ESTUDO DO PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO DO
METALAXIL E DO FOLPETE POR CULTURAS
MICROBIANAS MISTAS EM AMOSTRAS DE SOLO**

Maria do Rosário Caeiro Martins

**Dissertação apresentada à Universidade de Évora para obtenção do
Grau de Doutor em Química**

**ORIENTAÇÃO DO PROFESSOR DOUTOR JÚLIO MANUEL DA CRUZ MORAIS
E CO-ORIENTAÇÃO DO DOUTOR PABLO TAVARES PEREIRA**

Évora
2003



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

Departamento de Química

**DEGRADAÇÃO BIOLÓGICA DE
FUNGICIDAS EM AMOSTRAS DE SOLO
ESTUDO DO PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO DO
METALAXIL E DO FOLPETE POR CULTURAS
MICROBIANAS MISTAS EM AMOSTRAS DE SOLO**

Maria do Rosário Caeiro Martins



165 899

**Dissertação apresentada à Universidade de Évora para obtenção do
Grau de Doutor em Química**

**ORIENTAÇÃO DO PROFESSOR DOUTOR JÚLIO MANUEL DA CRUZ MORAIS
E CO-ORIENTAÇÃO DO DOUTOR PABLO TAVARES PEREIRA**

Évora
2003

À minha filha Ana Catarina

Ao meu marido José Manuel

Aos meus pais

Agradecimentos

Com a apresentação desta dissertação, quero deixar expresso o meu agradecimento a todos os que, directa ou indirectamente, contribuíram para que fosse possível a elaboração deste trabalho, tendo apenas como certa a minha amizade.

Ao Professor Doutor Júlio Manuel da Cruz Morais do Departamento de Química da Universidade de Évora, expresso o meu maior reconhecimento pelo empenho e ajuda incansável na orientação deste trabalho e pelas importantes sugestões e correcções efectuadas. Quero ainda agradecer a amizade, a forma como me sempre recebeu no seu grupo de trabalho e a confiança que em mim depositou.

Ao Doutor Pablo Tavares Pereira do Laboratório de Microbiologia Industrial (LMI) do INETI, quero manifestar o meu especial agradecimento pelo interesse e apoio constantes durante a orientação deste trabalho, pelas palavras de incentivo e ânimo, pela constante disponibilidade, pela ajuda indispensável e sugestões apresentadas para a escrita do trabalho e por toda a amizade que sempre soube dispensar-me.

Ao Doutor Carlos Roseiro, Director do LMI, um agradecimento especial pelas facilidades concedidas para a realização de parte do trabalho experimental, pelos reagentes e material gentilmente cedidos e pela forma cordial e amigável como sempre me recebeu durante a minha estadia no INETI.

À Eng^a Joana Guimarães do LMI agradeço toda a amizade e a preciosa ajuda na montagem dos protocolos das técnicas de biologia molecular. À Dra Eugénia Simas Marques agradeço todo o apoio prestado durante o trabalho realizado no LMI e a forma amigável com que sempre me recebeu.

Ao Doutor António Manuel Neto Vaz, Presidente do Departamento de Química quero agradecer a amizade e a forma como me apoiou e incentivou.

À Dra. Maria de Fátima Bastos Candeias e ao Doutor Rui Manuel Alves Ferreira o meu agradecimento pela ajuda e facilidades concedidas durante a realização do trabalho nos Laboratórios de Bioquímica. Agradeço também à Doutora Maria Teresa de Freitas Ferreira Tinoco o apoio e interesse manifestado pelo trabalho.

A todos os meus colegas do Departamento de Química da Universidade de Évora, em particular aos que comigo colaboraram e aos que me incentivaram e apoiaram durante a realização deste trabalho quero agradecer. Ao Dr. Henrique Chaveiro e ao Doutor António Pereira agradeço também a colaboração dada durante a escrita do trabalho.

Ao Doutor José Maria dos Santos Arteiro agradeço toda a disponibilidade e ajuda, em particular no tratamento estatístico de alguns resultados.

À Dra. Ana Teresa Fialho Caldeira um obrigado especial por toda a amizade e forma incansável como sempre me apoiou e ajudou durante a realização do trabalho.

Às Dras. Ana Cristina Costa e Célia Maria Antunes por toda a amizade e importantes conselhos e ajuda, especialmente, durante a elaboração da dissertação. À Dra. Margarida Figueiredo pela amizade e palavras de incentivo manifestadas.

À Doutora Maria Paula Alves Robalo pela ajuda prestada, pelas palavras amigas e de incentivo e interesse demonstrado pelo trabalho.

A todos os funcionários do Departamento de Química quero agradecer por todo o apoio que sempre me disponibilizaram, em especial à D. Maria Jesuína Vieira Mósca e à D. Anabela Charrua Cabeça, pela indispensável ajuda na preparação de material e reagentes necessários para a realização do trabalho experimental, e ainda, à D. Maria Helena Carvalho e ao Sr. Amílcar Romão pela colaboração nalguns ensaios realizados no âmbito do trabalho.

A todos os funcionários do LMI agradeço a forma amiga e acolhedora como me receberam e o apoio dado, directa ou indirectamente, durante a realização deste trabalho. À Dra. Manuela Cabrita agradeço também a ajuda dada na identificação das bactérias e a disponibilidade manifestada.

À Dra. Maria de Lurdes Pinheiro e aos técnicos do Laboratório de Química dos Solos, agradeço a ajuda na realização das análises físico-químicas dos solos e a forma como sempre fui recebida.

Ao Ministério da Educação o financiamento do Fundo Social Europeu, concedido no âmbito da medida 5/acção 5.3 (PRODEP III – Doutoramentos), que permitiu a minha dispensa de serviço docente e a aquisição de reagentes necessários para a realização deste trabalho.

Ao Departamento de Química, pelas facilidades e recursos disponibilizados.

Ao Instituto de Ciências Agrárias e Mediterrânicas (ICAM) pela utilização de equipamento durante a realização deste trabalho.

Quero também deixar expresso o meu reconhecimento a todos os que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e que não foi possível enumerar.

Aos meus maravilhosos pais agradeço todo o incentivo e ensinamentos que sempre me transmitiram e sem os quais não teria sido possível chegar até aqui. À minha querida irmã Ana Manuel agradeço toda a amizade e a forma como sempre me apoiou e incentivou.

Por último, um "obrigado muito especial" à minha querida filha Ana e ao meu marido, pelo amor, compreensão e palavras de incentivo com que sempre me apoiaram e ajudaram a superar todas as dificuldades, quando o tempo era demasiado curto para lhes dar todo o carinho e atenção que mereciam.

Resumo

A selecção de microrganismos do solo aptos para degradar compostos xenobióticos, como os fungicidas, pode ser particularmente útil para a biorremediação destes compostos no solo e evitar, assim, possíveis efeitos nefastos destes compostos como a degradação da qualidade do solo e das reservas de água e a consequente ameaça para os ecossistemas e seres vivos.

O metalaxil e o folpete são fungicidas de largo espectro de acção frequentemente aplicados, em associação, a várias culturas no controlo de fitopatogénicos da ordem Peronosporales, nomeadamente da *Plasmopara vitícola* (míldio da videira). O metalaxil possui um baixo coeficiente de adsorção no solo e um tempo de meia-vida geralmente elevado e variável com o tipo de solo. Uma vez que possui grande mobilidade nos solos e sofre uma lixiviação significativa, pode atingir concentrações elevadas no subsolo e contaminar facilmente águas subterrâneas. A presença de resíduos destes fungicidas nos alimentos ou nas águas bebíveis pode ser bastante nefasta para a saúde, nomeadamente em termos de toxicidade crónica, pelo que se torna importante proceder à biorremediação destes xenobióticos nos solos e águas.

Os estudos realizados foram efectuados com o objectivo principal de seleccionar, identificar e caracterizar microrganismos, isolados a partir de solos, que apresentem capacidade para degradar o metalaxil e susceptíveis de poderem, no futuro, vir a ser utilizados na biorremediação de solos.

O estudo de degradação dos fungicidas metalaxil e folpete, presentes numa formulação comercial que contém estes compostos na concentração de 10% (p/p) e de 40% (p/p), respectivamente, por populações microbianas mistas em solos com diferentes índices de exposição a esse fungicida mostrou que o solo que apresentou maior capacidade para degradar estes fungicidas foi o que tinha sido submetido a um maior número de tratamentos com a formulação comercial (solo A). Os solos em estudo, classificados, segundo a carta de solos 40 B, como solos Argiluvados do tipo mediterrânico apresentaram uma textura do tipo franco-argiloso e propriedades físico-químicas semelhantes, pelo que as diferenças observadas poderão ser devidas à variabilidade da população microbiana (quer em quantidade quer em diversidade) que interveio na degradação do metalaxil e do folpete, sugerindo uma especialização desta população à medida que aumenta o número de tratamentos da cultura com os fungicidas.

A degradação do metalaxil no solo foi essencialmente um processo biótico, uma vez que os solos sem população residente (previamente autoclavados) apresentaram valores muito baixos nos estudos de degradação. No entanto, para o folpete, embora este tenha sido predominantemente degradado na presença das populações microbianas dos solos, também se observou que parte da degradação do fungicida foi devida a factores abióticos.

A adição de antibióticos específicos (cloranfenicol e cicloheximida) a suspensões de solo com o fungicida comercial, através da determinação dos valores de oxigénio consumido e de dióxido de carbono produzido, mostrou que quer as bactérias quer os fungos pareceram intervir no processo de biotransformação do metalaxil e do folpete.

Como os fungos, devido ao seu modo de crescimento filamentosos, são geralmente mais eficazes do que as bactérias nos processos de biorremediação do solo, uma vez que podem expandir-se mais facilmente no solo, os ensaios de enriquecimento selectivo

e de tolerância foram efectuados a partir do inóculo misto dos fungos que tinham sido isolados do solo que apresentou uma degradação “facilitada” ao fungicida, com o objectivo de seleccionar fungos capazes de tolerar concentrações elevadas destes compostos.

Entre as 12 estirpes isoladas a partir do solo com maior capacidade de biodegradação, dois isolados (*Rhizopus stolonifer* e micélio estéril 3) apresentaram uma tolerância muito superior a altas concentrações de fungicida comercial com valores de EC_{50} superiores a 350 mg.L^{-1} deste fungicida. Esta última estirpe foi assim designada por não ter apresentado formação de estruturas reprodutoras nos meios testados mas, como mostrou elevada capacidade de resistência a altas concentrações de fungicida, tornou-se necessário proceder à sua identificação. Assim, após terem sido testados alguns processos para a indução da esporulação e de ter, então sido possível, identificar as estruturas reprodutoras, o fungo foi identificado como *Gongronella* sp.

O estudo de agrupamento molecular pela técnica de “fingerprinting” RAMP ou MSP-PCR foi efectuado com o objectivo de comparar o perfil molecular da estirpe isolada com as únicas duas espécies descritas na literatura para o género *Gongronella*: *G. butleri* e *G. lacrispora*. O grau de similaridade observado entre a estirpe isolada e as estirpes padrão foi inferior a 40%, pelo que a estirpe isolada poderá ser uma nova espécie embora, seja necessário realizar outros estudos para confirmar esta afirmação.

Paralelamente e, utilizando a mesma técnica de MSP-PCR, foram comparados os perfis electroforéticos de cada uma das estirpes obtidas antes e após o processo de selecção para cada um dos fungos seleccionados, tendo sido observado um grau de similaridade de 90% entre as duas estirpes de *Gongronella* sp. e de 65% entre as estirpes de *Rhizopus stolonifer*.

Os estudos de degradação em meio líquido e de quantificação da biomassa efectuados com as estirpes *Gongronella* sp. e *R. stolonifer* seleccionadas, em cultura pura, mostraram que ambos os fungos apresentaram capacidade para utilizar o metalaxil como substrato e que, mesmo após a fase de crescimento exponencial, estes fungos conseguiram degradar quantidades elevadas de fungicida.

Os estudos efectuados com folpete mostraram que, apesar das culturas de *Gongronella* sp. e de *R. stolonifer* também terem conseguido utilizá-lo como substrato, este composto se degradava facilmente em solução aquosa, com formação de ftalimida, quer na presença quer na ausência de microrganismos. Embora a degradação abiótica tenha sido inferior à degradação obtida na presença dos microrganismos, não se observou uma correlação entre a quantidade de folpete degradado por acção dos fungos em estudo e a quantidade de ftalimida formada. Assim, como o folpete apresentou uma taxa de degradação abiótica elevada e como os microrganismos seleccionados não apresentaram capacidade para utilizar a ftalimida como substrato, os estudos de degradação no solo após inoculação das estirpes seleccionadas incidiram apenas sobre o metalaxil.

Os estudos de degradação com biomassa fúngica, recolhida na fase estacionária das culturas, foram efectuados para confirmar que as estirpes seleccionadas foram capazes de utilizar o metalaxil como substrato mesmo após a fase exponencial de crescimento.

Os estudos de avaliação do crescimento dos fungos *Gongronella* sp. e *Rhizopus stolonifer*, efectuados na presença de várias concentrações de metalaxil, mostraram que o metalaxil se comportou como um substrato inibitório e que apresentou um comportamento cinético semelhante ao modelo de inibição de Haldane na presença de metalaxil como única fonte de carbono. Os baixos valores de K_s e os valores

relativamente elevados de K_i permitiram concluir que as espécies seleccionadas apresentaram grande afinidade para o metalaxil e que, apesar do efeito inibitório, possuíram capacidade para tolerar altas concentrações deste fungicida. Deste modo, o processo de degradação do metalaxil pelas estirpes seleccionadas poderá ter um potencial de aplicação prático como meio de redução do tempo de meia-vida deste fungicida nos solos.

Finalmente, considerou-se importante avaliar a capacidade de adaptação de cada uma destas estirpes ao solo e estudar o processo de degradação do metalaxil presente em solos contaminados na presença das estirpes seleccionadas.

Os estudos efectuados na presença e na ausência da população residente mostraram que as amostras de solo que foram inoculadas as estirpes seleccionadas, em cultura pura ou em cultura mista, apresentaram um aumento significativo na taxa de degradação do metalaxil relativamente à observada em amostras equivalentes mas contendo apenas população residente.

A determinação indirecta da biomassa no solo na presença de quantidades crescentes de metalaxil, mostrou que as duas estirpes seleccionadas conseguiram usar o fungicida como substrato no solo e que o metalaxil se comportou como um substrato inibitório, apresentando um comportamento cinético que obedeceu ao modelo de Haldane. No entanto, apesar do efeito inibitório, os fungos isolados apresentaram uma afinidade elevada para o fungicida e, capacidade para tolerar concentrações elevadas deste composto.

Tendo em conta os objectivos a que nos propusemos, neste trabalho foram seleccionados após enriquecimento e identificação, dois fungos, *Gongronella* sp. e *Rhizopus stolonifer*, que apresentaram capacidade para biodegradar o metalaxil em

solução aquosa e em amostras de solo. A estirpe *Gongronella* sp. isolada parece ser uma nova espécie, tendo em conta as diferenças observadas nos perfis moleculares obtidos por MSP-PCR da estirpe isolada relativamente às duas espécies conhecidas deste mesmo género (*G. butleri* e *G. lacrispora*).

Os fungos *Gongronella* sp. e *Rhizopus stolonifer*, quando adicionados ao solo, mostraram capacidade para se adaptar e para crescer na presença e na ausência da população residente desses solos, conseguindo diminuir significativamente o tempo de meia-vida do metalaxil no solo, pelo que podem dar um importante contributo no processo de biorremediação de solos contaminados com o fungicida.

Palavras-Chave: Metalaxil, Folpete, Biodegradação, Fungicidas, Solo; *Gongronella* sp., *Rhizopus stolonifer*.

Summary

Selection of microorganisms able to degrade xenobiotic compounds, such as the fungicides, could be useful to enhanced degradation of these compounds in the soil and to avoid the deterioration of soil and water quality, as well as the consequent damage for the ecosystems and human health. Detoxification of pesticides through biological treatments is receiving serious attention as an alternative to existing methods, such as incineration and landfill.

In agricultural practices, the fungicides metalaxyl and folpet has been often applied in association, to protect several cultures, in particular, vineyards, against the down mildew (*Plasmopara viticola*). Metalaxyl is characterized by a low adsorption coefficient in the soil and a long and variable half-life according soil type and microflora present. It has a great mobility in the soils and a significant leaching, could be found at high concentrations in the subsoil and groundwater. The presence of metalaxyl and folpet residues in food or in drinking water could be a serious health threat, mostly in concerning to chronic toxicity. So that becomes important to proceed to the bioremediation of these xenobiotics in soils and waters.

In this dissertation, the experiments were performed with the main aim of selection of microorganisms able to degrade the metalaxyl and that could use, in the future, to the bioremediation process to remove metalaxyl from the soils.

The degradation studies of metalaxyl and folpet for soils with different history treatments of a commercial formulation that contains metalaxyl (10% p/p) and folpet (40%

p/p) showed high degradation ability in the soil that was submitted to a higher treatments number of with this formulation. The soils under study were classified as Mediterranean Alfisols, classified according soil map 40 B of Soils of Portugal and were presented the same textural class, Clay Loam type, and, consequently, similar physic-chemistry properties. In this order, differences in degradation ability were due to the variability of the microbial population that was able to degrading metalaxyl and folpet. The enhanced biodegradation suggests a specialization of this population with the number of vineyard treatments with these fungicides.

Metalaxyl degradation was mainly a biological process performed by the soil microorganisms. Studies with soil samples submitted to a previously sterilization in autoclave (abiotic control) showed a small degradation rate. Folpet degradation studies seems that degradation was predominantly a biological process, although this fungicide showed also some abiotic degradation.

Addition of specific antibiotics compounds (chloranphenicol and cycloheximide) to soil solutions containing commercial formulation of fungicides showed that both bacterial and fungi population could be active in the transformation of these fungicides in the soil.

Filamentous fungi were generally more effective than bacteria in the bioremediation processes in the soil, because fungi are able to extend the location of their biomass through hyphal growth and easily could adapted to size and irregular forms of soils particles. Thereby, studies for the selective enrichment were performed with fungal isolates of the soil with enhanced biodegradation ability, for the purpose of the selection of fungi strains able to tolerate high concentrations of these fungicides.

Amongst twelve fungi strains isolated from the soil that has presented higher biodegradation capacity, two isolates (*Rhizopus stolonifer* and sterile mycelium 3)

developed a particularly high tolerance for the fungicides. Using specific methods for inducing sporulation, sterile mycelium 3 was identified as *Gongronella* sp.

Once this fungus is of rare frequency, molecular approaches were carried out using a fingerprinting procedure (MSP-PCR) for comparison the isolate with two type strains *Gongronella lacrispora* ATCC 24412 and *G. butleri* ATCC 8989. The results of this study suggest that the isolated *Gongronella* sp. is probably a new specie of this fungal genus, although, it need be confirmed with further studies.

After selective enrichment, degradation studies and biomass quantification with *Gongronella* sp. and *R. stolonifer* strains, performed to the study of metalaxyl behavior in aqueous solutions, showed that both fungi strains presented ability to use the metalaxyl as sole carbon source and even after the exponential growth phase they could degrade high amounts of metalaxyl.

Folpet degradation studies showed that, in spite *Gongronella* sp. and *R. stolonifer* strains could also use it as sole carbon source, this compound was rapidly degraded in aqueous solution with ftalimide formation, either in presence or not of these microorganisms. Although the abiotic degradation seem been smaller than the degradation observed in the presence of theses fungal strains, it was not observed a correlation with folpet biodegradation and ftalimide formation. Thus, as the folpet presented a high rate of abiotic degradation and the selected strains did not able to use ftalimide as carbon source, the degradation assays in soil with selected strains were done only with metalaxyl.

Studies about metalaxyl degradation with fungal biomass, previously, taken in the stationary phase were caring out to confirm that the selected fungi were able to degrade metalaxyl even after the exponential phase growth.

The inhibitory effects at high concentrations of metalaxyl for *Gongronella* sp. and *R. stolonifer* strains were studied in the presence of growing concentrations of metalaxyl, used as the only source of carbon. Analyzed according to the Haldane model, results showed that these two strains presented an inhibitory kinetic profile at the high concentrations of metalaxyl. The low K_s and higher K_i values showed that these strains present a high affinity to metalaxyl as substrate and are considerably high resistant to this compound and suggest that the selected strains could be a valuable source used in soil bioremediation.

Finally, with the aim to evaluate the capacity of each strain to grow and transform metalaxyl in soil samples, degradation studies were carried out adding these fungal strains to the soil sample with metalaxyl. Studies performed in soil samples in the absence or in the presence of the soil population showed that these enriched strains could increase significantly the metalaxyl degradation rate relatively to the resident soil population.

Decreases in oxygen rate determined to evaluate the fungal biomass present in the soil samples in the presence of growing amounts of metalaxyl, showed that these two selected strains could use this fungicide in the soil as a substrate and presented an inhibitory behavior according to the Haldane kinetic profile. In spite of the inhibitory effect, the strains showed high affinity for the fungicide and significant tolerance to high concentrations of this compound.

According to the objectives that we have proposed, in this work we have successfully isolated two metalaxyl-degrading fungal strains: *Gongronella* sp. and *R. stolonifer*. The differences observed in the molecular profile obtained by a molecular procedure (MSP-PCR) when compared with two-type strains, *G. butleri* e *G. lacrispora*, show that *Gongronella* sp. isolated by us was probably a new species of this fungal genus. *Gongronella* sp. and *R. stolonifer*, after inoculation, showed the ability to adapt, grow and

degrade the metalaxyl in soil with a decrease of metalaxil half-life in the soil and could be valuable applications for metalaxyl bioremediation in polluted sites.

Keywords: Metalaxyl, Folpet, Fungicide, Biodegradation, Soil, Fungi, *Gongronella* sp., *Rhizopus stolonifer*.

Abreviaturas

ATCC – “American Type Culture Collection”

CAS – “Chemical Abstracts Service “ (American Chemical Society)

CRB – “Rose – Bengal Cloranfenicol Agar”

EC₅₀ – concentração efectiva de um composto que provoca um efeito inibitório de 50% no crescimento de uma determinada população microbiana

EPA – “Environmental Protection Agency “

FAO – “Food and Agricultural Organization”

HPLC – “High Performance Liquid Chromatography “

ISA – “Iónico Strength Adjuster”

IUPAC – “International Union of Pure and Applied Chemistry”

GC – “Gas Chromatography”

K_i – constante de inibição

K_s – constante de saturação para o substrato

MEA – “Malt Extract Agar”

MEB – “Malt Extract Broth”

MSP - PCR – “Microsatellite - Primed PCR”

PCR – “Polymerase Chain Reaction”

pb – par de bases

RAMP – “Random Amplified Microsatellite Polymorphisms”

RAPD – “Random Amplified Polymorphic DNA”

rpm – rotações por minuto

r² – coeficiente de determinação

[S] – concentração de substrato

S_{mi} - concentração mínima inibitória de substrato

SSF – “Solid State Fermentation”

T - capacidade de troca catiónica

t - tempo

TSA – “Tryptic Soy Agar”

ufc – unidades formadoras de colónias

UPMGA – “Unweighted pair group with arithmetic averages”

X – concentração de biomassa

X₀ – concentração inicial de biomassa

YNB – “Yeast Nitrogen Base”

YNBG – “Yeast Nitrogen Base” + glucose a 10% (p/p)

μ – taxa específica de crescimento

μ_{máx} – taxa específica de crescimento máxima

λ – comprimento de onda

Índice Geral

AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vii
SUMMARY	xiii
ABREVIATURAS	xix
ÍNDICE GERAL	xxi
ÍNDICE DE TABELAS	xxvii
ÍNDICE DE FIGURAS	xxxii
NOTA INTRODUTÓRIA	1
OBJECTIVOS	5
ESTRUTURA GERAL DA DISSERTAÇÃO	7
1 - ASPECTOS GERAIS DA INTERACÇÃO ENTRE OS FUNGICIDAS, OS SERES VIVOS E O AMBIENTE	9
1.1 Introdução	9
1.2 Propriedades físico-químicas dos fungicidas	13
1.3 Os fungicidas e os fungos fitopatogénicos	17
1.3.1 Principais aplicações dos fungicidas metalaxil e folpete	18
1.3.2 Mecanismos de acção dos fungicidas	20
1.4 Interacção dos fungicidas com os microrganismos não fitopatogénicos	22
1.4.1 Degradação microbiana dos fungicidas	23
1.4.1.1 Metalaxil	25
1.4.1.2 Folpete	27
1.4.2 Toxicidade para os microrganismos	27
1.5 Interacção dos fungicidas com as plantas	28

1.5.1.1	Metabolismo e toxicidade do metalaxil nas plantas	29
1.5.1.2	Metabolismo e toxicidade do folpete nas plantas	32
1.6	Interacção dos fungicidas com os animais	35
1.6.1	Metabolismo dos fungicidas nos animais	35
1.6.1.1	Metalaxil	36
1.6.1.2	Folpete	38
1.6.2	Toxicidade dos fungicidas	40
1.6.2.1	Metalaxil	42
1.6.2.1	Folpete	44
1.7	Distribuição e persistência dos fungicidas nos ecossistemas	45
1.7.1	Ecossistemas terrestres	47
1.7.1.1	Metalaxil	50
1.7.1.2	Folpete	53
1.7.2	Ecossistemas aquáticos	53
1.7.2.1	Ecossistemas naturais	53
1.7.2.2	Águas subterrâneas e sedimentos	57
1.8	Biorremediação de solos contaminados	59
2	- AVALIAÇÃO DO PERFIL DE BIODEGRADAÇÃO DO METALAXIL E FOLPETE POR POPULAÇÕES AUTÓCTONES DE AMOSTRAS DE SOLO MEDITERRÂNICO DO ALENTEJO COM DIFERENTES NÍVEIS DE EXPOSIÇÃO AOS FUNGICIDAS EM ESTUDO	69
2.1	Introdução	69
2.2	Materiais e Métodos	72
2.2.1	Fungicidas utilizados	72
2.2.2	Solos em estudo	73
2.2.3	Recolha e conservação das amostras	74
2.2.4	Estudo físico-químico	74
2.2.5	Estudo microbiológico	80
2.2.6	Manutenção dos microrganismos	82

2.2.6.1	Armazenamento de curta duração	82
2.2.6.2	Armazenamento de longa duração	83
2.2.7	Avaliação do perfil de degradação do metalaxil e do folpete	84
2.2.7.1	Condições de incubação	84
2.2.7.2	Preparação dos extractos	85
2.2.7.3	Quantificação dos fungicidas por HPLC	86
2.2.7.4	Análise Estatística	86
2.2.8	Estudo do tipo de microrganismos (bactérias ou fungos) que mais contribuem para o processo de degradação dos fungicidas nas amostras de solo	88
2.2.8.1	Condições de incubação	90
2.2.8.2	Determinação do O ₂ e do CO ₂	90
2.2.8.3	Determinação semi-quantitativa da população microbiana presente	91
2.3	Resultados	92
2.3.1	Estudo físico-químico	92
2.3.2	Estudo microbiológico	94
2.3.3	Biodegradação do metalaxil e do folpete	100
2.3.3.1	Biodegradação do metalaxil nos solos	102
2.3.3.2	Biodegradação do folpete nos solos	106
2.3.4	Estudo do tipo de microrganismos (bactérias ou fungos) que mais contribui para o processo de degradação dos fungicidas nas amostras de solo	111
2.4	Discussão	118
3	– SELECÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE FUNGOS COM CAPACIDADE PARA DEGRADAR OS FUNGICIDAS	127
3.1	Introdução	127
3.1.1	Seleção de fungos tolerantes ao metalaxil e ao folpete	127
3.1.2	Métodos moleculares para a caracterização de estirpes fúngicas	130
3.2	Materiais e Métodos	133
3.2.1	Microrganismos estudados	133
3.2.2	Ensaio de seleção de espécies tolerantes aos fungicidas metalaxil e folpete	134

3.2.3	Ensaio de confirmação em meio sólido	136
3.2.4	Determinação dos valores de EC ₅₀ do fungicida comercial para os fungos seleccionados	137
3.2.5	Identificação da estirpe designada por micélio estéril 3	138
3.2.6	Manutenção dos microrganismos isolados	139
3.2.7	Análise molecular da estirpe fúngica <i>Gongronella</i> sp.	140
3.2.7.1	Organismos	140
3.2.7.2	Extracção do DNA	140
3.2.7.3	Avaliação da integridade do DNA e quantificação em gel de agarose	141
3.2.7.4	Quantificação do DNA por espectrofotometria	142
3.2.7.5	Análise por MSP-PCR	142
3.2.8	Caracterização das estirpe fúngica <i>Gongronella</i> sp. e <i>Rhizopus stolonifer</i> por métodos moleculares	144
3.2.8.1	Organismos em estudo	144
3.2.8.2	Extracção do DNA	144
3.2.8.3	Avaliação da integridade do DNA e quantificação	145
3.2.8.4	Análise por MSP-PCR	145
3.3	Resultados	145
3.3.1	Enriquecimento selectivo de espécies tolerantes ao metalaxil em cultura mista	145
3.3.2	Ensaio de confirmação em meio sólido e determinação dos valores de EC ₅₀ e selecção de estirpes fúngicas	147
3.3.3	Identificação do micélio estéril 3	151
3.3.4	Seleccção das estirpes com capacidade de resistir a concentrações elevadas de metalaxil e folpete	154
3.3.5	Identificação da estirpe <i>Gongronella</i> sp. por MSP-PCR	154
3.3.5.1	Análise da integridade do DNA	154
3.3.5.2	Caracterização dos fragmentos de MSP-PCR	154
3.3.6	Caracterização molecular das estirpes <i>Gongronella</i> sp. e <i>Rhizopus stolonifer</i> isoladas antes e após o enriquecimento por MSP-PCR	158
3.4	Discussão	163

4 - ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO DO METALAXIL E DE FOLPETE EM SOLUÇÃO AQUOSA	169
4.1 Introdução	169
4.2 Materiais e Métodos	174
4.2.1 Microrganismos	174
4.2.2 Fungicidas utilizados	174
4.2.3 Preparação do inóculo	174
4.2.4 Estudo da degradação dos fungicidas em meio líquido	175
4.2.4.1 Condições de crescimento	175
4.2.4.2 Determinação do peso seco da biomassa	176
4.2.4.3 Preparação dos extractos	177
4.2.4.4 Quantificação dos fungicidas	178
4.2.5 Estudos de degradação do metalaxil por biomassa obtida na fase estacionária	179
4.2.5.1 Condições de ensaios	179
4.2.5.2 Quantificação do metalaxil	180
4.2.6 Avaliação do crescimento, em cultura pura, das estirpes <i>Gongronella</i> sp. e <i>Rhizopus stolonifer</i> em meio aquoso com metalaxil como única fonte de carbono	180
4.2.6.1 Condições de crescimento	180
4.2.6.2 Determinação das taxas específicas de crescimento	181
4.3 Resultados	181
4.3.1 Estudos de degradação do metalaxil em solução aquosa	181
4.3.2 Estudos de degradação do folpete em solução aquosa	194
4.3.3 Estudo da capacidade de degradação do metalaxil por biomassa obtida na fase estacionária	211
4.3.4 Estudos cinéticos de crescimento dos fungos <i>Gongronella</i> sp. e de <i>Rhizopus stolonifer</i> na presença de metalaxil	214
4.4 Discussão	220
5- ESTUDO DOS NÍVEIS DE DEGRADAÇÃO DO METALAXIL NO SOLO PELOS FUNGOS APÓS SELECÇÃO EM CULTURA PURA E EM CULTURA MISTA, NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DA POPULAÇÃO RESIDENTE	227

5.1	Introdução	227
5.2	Materiais e Métodos	233
5.2.1	Organismos em estudo	233
5.2.2	Preparação do inóculo	233
5.2.3	Fungicidas utilizados	233
5.2.4	Solo em estudo	234
5.2.5	Avaliação do perfil de biodegradação do metalaxil	234
5.2.5.1	Condições de crescimento	236
5.2.5.2	Extracção dos fungicidas	237
5.2.5.3	Quantificação	237
5.2.5.4	Análise estatística	238
5.2.6	Estudo microbiológico	239
5.2.7	Avaliação do crescimento em cultura pura das estirpes <i>Gongronella</i> sp. e <i>Rhizopus stolonifer</i> no solo	239
5.3	Resultados	241
5.3.1	Avaliação da capacidade de degradação do metalaxil no solo pelas estirpes seleccionadas	241
5.3.2	Estudo microbiológico	249
5.3.3	Estudos da cinética de degradação do metalaxil em solos pelos fungos <i>Gongronella</i> sp. e <i>Rhizopus stolonifer</i>	251
5.4	Discussão	259
6- CONCLUSÕES		261
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		269
ANEXOS		295
Anexo I		297
Anexo II		301
Anexo III		305
Anexo IV		309

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 -	Características físico-químicas do metalaxil	15
Tabela 1.2 -	Características físico-químicas do folpete	16
Tabela 1.3 -	Classificação dos fungos patogénicos de acordo com a sua principal via de infecção nas plantas e referência aos fungicidas mais eficazes	19
Tabela 1.4 -	Classificação do potencial carcinogénico dos pesticidas pela EPA	42
Tabela 2.1 -	Caracterização físico-química dos solos em estudo	93
Tabela 2.2 -	Média de unidades de formação de colónias total (ufc . g ⁻¹ solo) em TSA e em CRB com cloranfenicol	94
Tabela 2.3 -	Algumas características dos microrganismos isolados em TSA	95
Tabela 2.4 -	Registo das diferentes populações de fungos filamentosos isolados e da frequência com que ocorrem nos solos	99
Tabela 2.5 -	Registo da quantidade de metalaxil degradada por grama de solo (peso seco) aos 0, 42 e 70 dias de incubação nos três solos e para as três concentrações de fungicida comercial aplicadas	102
Tabela 2.6 -	Taxas de degradação do metalaxil expressas em µg.g ⁻¹ .dia ⁻¹	105
Tabela 2.7 -	Registo da quantidade de folpete degradada por grama de solo aos 0, 42 e 70 dias de incubação nos três solos e para as três concentrações de fungicida comercial aplicadas	107
Tabela 2.8 -	Taxas de degradação expressas em µg de folpete por grama de solo por dia	110
Tabela 2.9 -	Valores coeficientes respiratórios (QR)	116
Tabela 3.1 -	Efeito das diferentes concentrações de fungicida comercial no crescimento das doze estirpes fúngicas isoladas, em meio de extracto de malte líquido	146
Tabela 3.2 -	Registo dos valores de EC ₅₀ (mg.L ⁻¹ de fungicida comercial) para os fungos em estudo	150
Tabela 3.3 -	Registo das observações dos ensaios realizados para indução da esporulação	152

Tabela 4.1 –	Registo da quantidade de metalaxil degradado aos 0, 21 e 42 dias de incubação nas culturas de <i>Gongronella</i> e <i>Rhizopus stolonifer</i> em YNBG	184
Tabela 4.2 –	Registo da quantidade de metalaxil degradado aos 0, 42 e 70 dias de incubação nas culturas de <i>Gongronella</i> e <i>Rhizopus stolonifer</i> em YNB	184
Tabela 4.3 -	Registo dos valores médios das taxas de degradação de metalaxil ($\mu\text{M}\cdot\text{dia}^{-1}$) e das taxas de específicas de crescimento (μ) para as estirpes seleccionadas	193
Tabela 4.4 -	Registo dos valores médios das taxas de degradação de metalaxil ($\mu\text{M}\cdot\text{dia}^{-1}$) e das taxas de específicas de crescimento (μ) para as estirpes seleccionadas	194
Tabela 4.5 -	Taxas de específicas de crescimento (μ) observadas para as estirpes seleccionadas e das taxas de degradação de folpete nos estudos de degradação abiótica e biótica.	194
Tabela 4.6 -	Registo da quantidade de folpete degradado nas culturas de <i>Gongronella</i> e <i>Rhizopus stolonifer</i>	198
Tabela 4.7 -	Registo da quantidade de ftalimida formada nas culturas de <i>Gongronella</i> e <i>Rhizopus stolonifer</i>	199
Tabela 4.8 -	Taxas específicas de crescimento observadas para as estirpes seleccionadas e das taxas de degradação do folpete nos estudos de degradação abiótica e biótica	209
Tabela 4.9 -	Registo dos valores das taxas de degradação de ftalimida nos estudos de degradação abiótica e biótica em YNBG e YNB	210
Tabela 4.10 -	Valores das taxas específicas de crescimento das espécies <i>Gongronella</i> e <i>R. stolonifer</i> em meios de cultura de YNB para as várias concentrações de metalaxil.	215
Tabela 4.11 -	Valores das constantes cinéticas $\mu_{\text{máx}}$ e K_s obtidas por três métodos de linearização para as estirpes de <i>Gongronella</i> sp. e <i>Rhizopus stolonifer</i> quando cultivadas em meio de YNB na presença de metalaxil como única fonte de carbono	219
Tabela 4.12 -	Valores das constantes cinéticas $\mu_{\text{máx}}$ e K_i e de S_{mi} para as estirpes de <i>Gongronella</i> sp. e <i>Rhizopus stolonifer</i> obtidas nas culturas de YNB na presença de metalaxil como única fonte de carbono	219
Tabela 5.1 -	Registo da quantidade de metalaxil degradada aos 42 dias, para uma concentração inicial de 50 μg de metalaxil por grama de solo (peso seco),	

	após a adição dos microrganismos seleccionados no solo estéril (sem microrganismos) e no solo contendo a população residente	244
Tabela 5.2 -	Média de unidades de formação de colónias total (ufc) por grama de solo em CRB com cloranfenicol (população fúngica)	250
Tabela 5.3 -	Valores das constantes cinéticas $T_{máx}$ (expressa em $\text{mmol O}_2 \cdot \text{dia}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ solo) e K_s (expressa em $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ solo) calculadas por três métodos de linearização para as estirpes de <i>Gongronella</i> sp. e <i>Rhizopus stolonifer</i> quando cultivadas no solo autoclavado na presença de metalaxil como principal fonte de carbono.	254
Tabela 5.4 -	Valores das constantes cinéticas $T_{máx}$ e K_i e de S_{mi} para as estirpes de <i>Gongronella</i> sp. e <i>Rhizopus stolonifer</i> quando cultivadas no solo autoclavado na presença de metalaxil como principal fonte de carbono	254

Índice de Figuras

Figura 1.1 -	Principais processos de transporte e de transformação dos pesticidas nos vários compartimentos ambientais	11
Figura 1.2 -	Estrutura química do metalaxil	14
Figura 1.3 -	Estrutura química do folpete	16
Figura 1.4 -	Possíveis vias de degradação do metalaxil no solo	26
Figura 1.5 -	Degradação do folpete em solução aquosa	27
Figura 1.6 -	Possíveis produtos da degradação do metalaxil detectados em plantas e culturas de tecidos	31
Figura 1.7 -	Possíveis percursos de degradação do folpete nas plantas	34
Figura 1.8 -	Percurso metabólico proposto pela EPA para a degradação do metalaxil nos ratos	37
Figura 1.9 -	Percurso metabólico de degradação dos triclorometiltiolderivados nos sistemas biológicos	39
Figura 1.10 -	Produtos resultantes da irradiação do metalaxil em solução aquosa	55
Figura 1.11 -	Factores a considerar no desenvolvimento do processo de biorremediação	60
Figura 1.12 -	Biorremediação: dando uma “mão” para beneficiar a natureza	63
Figura 2.1 -	Excerto da Carta de Solos de Portugal 40 B	75
Figura 2.2 -	Esquema geral do processo de isolamento dos microrganismos em amostras de solos	81
Figura 2.3 -	Esquema do procedimento utilizado para avaliação do grupo de microbiota que mais contribui para a degradação dos metalaxil e folpete em solos	89
Figura 2.4 -	Cromatogramas obtidos aos 0 dias e após 42 dias de incubação para o solo A para a concentração de 0,5 mg de fungicida comercial por grama de solo	101
Figura 2.5 -	Degradação do metalaxil nos solos em estudo para as diferentes concentrações de fungicida comercial aplicadas	104
Figura 2.6 -	Degradação do folpete nos solos em estudo para as diferentes concentrações de fungicida comercial aplicadas	109

Figura 2.7 -	Valores das taxas de consumo de O ₂ e produção de CO ₂ (mmol.dia ⁻¹) e do número de microrganismos isolados em TSA e CRB (ufc.mL ⁻¹) quando se utilizou glucose como fonte adicional de carbono	113
Figura 2.8 -	Valores das taxas de consumo de O ₂ e produção de CO ₂ (mmol.dia ⁻¹) e do número de microrganismos isolados em TSA e CRB (ufc. mL ⁻¹) quando se utilizou fungicida comercial contendo metalaxil e folpete como fonte adicional de carbono	115
Figura 2.9 -	Valores das taxas de consumo de O ₂ e produção de CO ₂ (mmol.dia ⁻¹) e do número de microrganismos isolados em TSA e CRB (ufc. mL ⁻¹) quando se utilizou o fungicida na concentração de 0,25 mg.mL ⁻¹	117
Figura 3.1 -	Esquema do ensaio de selecção, em meio líquido, para obter espécies tolerantes aos fungicidas metalaxil e folpete	135
Figura 3.2 -	Representação gráfica da percentagem de inibição em função do logaritmo da concentração de fungicida comercial contendo metalaxil (10% p/p) e folpete (40% p/p) para os fungos <i>Penicillium</i> sp. 1 e sp. 2 e micélio estéril	148
Figura 3.3 -	Representação gráfica da percentagem de inibição em função do logaritmo da concentração de fungicida comercial contendo metalaxil (10% p/p) e folpete (40% p/p) para os fungos <i>Rhizopus stolonifer</i> e micélio estéril 3	149
Figura 3.4 -	Algumas das características macroscópicas e microscópicas da <i>Gongronella</i> sp	153
Figura 3.5 -	Algumas das características macroscópicas e microscópicas do <i>R. stolonifer</i>	155
Figura 3.6 -	Electroforese do DNA obtido para as estirpes de <i>Gongronella</i> spp.	157
Figura 3.7 -	Electroforetogramas obtidos após MS-PCR para as estirpes de <i>Gongronella</i>	157
Figura 3.8 -	Dendograma do perfil da electroforese obtida após MSP-PCR para a estirpe <i>Gongronella</i> sp. isolada do solo e para as estirpes padrão de <i>Gongronella butleri</i> e <i>Gongronella lacrispora</i>	157
Figura 3.9 -	Electroforese do DNA obtido das estirpes de <i>Gongronella</i> sp. e de <i>Rhizopus stolonifer</i>	159
Figura 3.10 -	Electroforetogramas obtidos após MSP-PCR para os fungos seleccionados obtidas antes e após o enriquecimento selectivo	160
Figura 3.11 -	Dendogramas dos perfis de electroforese obtidos após MSP-PCR para as estirpe de <i>Rhizopus stolonifer</i> e de <i>Gongronella</i> sp. obtidas antes e após o ensaio de selecção	161

Figura 4.1-	Cromatogramas obtidos aos 0 e 21 dias para a estirpe de <i>Rhizopus stolonifer</i> em meio de YNB na presença de metalaxil na concentração de 10 mg.L ⁻¹	183
Figura 4.2 -	Registo das percentagens de metalaxil degradado pelas estirpes de <i>Gongronella</i> sp e <i>R stolonifer</i> em meio de YNBG	187
Figura 4.3 -	Registo das percentagens de metalaxil degradado pelas estirpes de <i>Gongronella</i> sp. e <i>R stolonifer</i> em meio de YNB	187
Figura 4.4 -	Curvas de crescimento dos microrganismos seleccionados obtidas nas culturas em meio de YNBG com metalaxil	189
Figura 4.5 -	Curvas de crescimento dos microrganismos seleccionados obtidas nas culturas em meio de YNB com metalaxil	189
Figura 4.6 -	Perfis do aumento da biomassa de <i>Gongronella</i> sp. e da degradação do metalaxil em YNB	191
Figura 4.7 -	Perfis do aumento da biomassa de <i>Rhizopus stolonifer</i> em relação ao perfil de degradação do metalaxil em YNB para as diferentes concentrações	192
Figura 4.8 -	Cromatogramas obtidos aos 0 e 16 dias para as culturas de <i>R. stolonifer</i> em meio de YNB na presença de folpete na concentração de 20 mg.L ⁻¹	196
Figura 4.9 -	Cromatogramas obtidos aos 0 e 16 dias na ausência de microrganismos no meio de YNB na presença de 20 mg.L ⁻¹ de folpete	197
Figura 4.10 -	Registo das percentagens de folpete degradado na ausência e na presença dos microrganismos seleccionados nos meio de YNBG e de YNB	200
Figura 4.11 -	Registo das percentagens de ftalimida formada na ausência e na presença dos microrganismos seleccionados em meio de YNBG e de YNB	202
Figura 4.12 -	Curvas de crescimento nas culturas de <i>Gongronella</i> sp. e de <i>Rhizopus stolonifer</i> nos meios de YNB e de YNBG na presença de folpete	205
Figura 4.13 -	Perfil do crescimento da biomassa de <i>Gongronella</i> sp. em relação ao perfil de degradação do folpete em meio de YNB para as duas concentrações estudadas	206
Figura 4.14 -	Perfil do crescimento da biomassa de <i>Rhizopus stolonifer</i> . em relação ao perfil de degradação do folpete em meio de YNB para as duas concentrações estudadas	207
Figura 4.15 -	Registo das percentagens de metalaxil remanescente no estudo de degradação do metalaxil na presença da biomassa de <i>Gongronella</i> sp. no estado estacionário	212

Figura 4.16 - Registo das percentagens de metalaxil remanescente no estudo de degradação do metalaxil na presença da biomassa de <i>Rhizopus stolonifer</i> no estado estacionário	213
Figura 4.17 - Relação entre as taxas de crescimento de <i>Gongronella</i> sp. e de <i>Rhizopus stolonifer</i> e a concentração de metalaxil utilizada como única fonte de carbono	216
Figura 4.18 - Linearização das concentrações não inibitórias de metalaxil pelo método de Linewaver-Burk	218
Figura 4.19 - Linearização das concentrações inibitórias de metalaxil	218
Figura 5.1 - Esquema do procedimento utilizado para avaliação da capacidade de biodegradação do metalaxil em solos pelas estirpes seleccionadas na presença e ausência de população residente e comparação com a capacidade de degradação da população residente (controlo)	235
Figura 5.2 - Cromatogramas obtidos aos 0 dias e após 42 dias de incubação nas amostras de solo A contendo metalaxil na concentração de 0,05 mg.g ⁻¹ solo (p.s) e às quais foi adicionado o inóculo de <i>Rhizopus stolonifer</i>	242
Figura 5.3 - Cromatogramas obtidos aos 0 dias e após 42 dias de incubação nas amostras de solo A contendo metalaxil na concentração de 0,05 mg.g ⁻¹ solo (p.s) e às quais foi adicionado o inóculo de <i>Gongronella</i> sp	243
Figura 5.4 - Valores do metalaxil remanescente (%) nos solos em estudo pelas estirpes de <i>Gongronella</i> sp e <i>R stolonifer</i>	243
Figura 5.5 - Taxas de degradação do metalaxil expressas em µg.dia ⁻¹ .g ⁻¹ solo	245
Figura 5.6 - Relação entre as taxas de consumo de Oxigénio e a concentração de metalaxil adicionada aos solos na presença de <i>Gongronella</i> sp e <i>R stolonifer</i>	253

Nota Introdutória

O desenvolvimento da indústria vinícola, a necessidade de obter uvas em boas condições fitossanitárias e, conseqüentemente, de vinhos com qualidade exige a utilização frequente de fungicidas para protecção e tratamento da vinha. A cultura da vinha (*Vitis vinifera* L.) ocupa uma extensão considerável em Portugal sendo na sua maioria destinada à industria vinícola.

Quer pela sua extensão, quer pelos produtos a que dá origem, a cultura da vinha é, em termos sócio-económicos, uma das mais importantes do país, em particular no Alentejo. As doenças da vinha têm uma importância crucial na produção vitícola que se traduz por uma diminuição da quantidade e da qualidade do vinho. A cultura da vinha é de longe aquela onde se aplicam mais produtos fitofarmacêuticos, normalmente para protecção das doenças de origem fúngica. Entre os principais agentes patogénicos da vinha, nos países mediterrânicos, pode distinguir-se *Plasmopara viticola* Berlese et de Toni causadora do míldio e *Uncinula necator* (Schw) Burr causadora do oídio que, em Portugal, são responsáveis por cerca de 30% do consumo total de produtos fitofarmacêuticos. Para proteger as culturas de *Vitis vinifera* contra *Plasmopara viticola* utiliza-se, frequentemente, uma preparação comercial que contém os fungicidas **metalaxil** (10% p/p) e **folpete** (40% p/p).

Apesar das vantagens económicas, a utilização de fungicidas, mesmo em protecção integrada, pode implicar um impacto negativo para os ecossistemas e seres vivos. Embora o fungicida comercial seja de aplicação foliar neste tipo de cultura, o metalaxil e o folpete tendem a depositar-se nos solos, quer devido à dispersão aquando a

aplicação sob a forma de aerossol quer por escorrimento a partir das folhas. A acumulação destes produtos ou seus derivados nos solos interfere com o funcionamento normal dos habitats, podendo ser arrastados pela água e contaminar lençóis aquíferos utilizados para o consumo humano.

Os microrganismos do solo desempenham um papel fundamental na degradação de xenobióticos em solos, incluindo muitos pesticidas. Os processos de biodegradação de xenobióticos por bactérias e fungos têm sido estudados nos últimos anos, tendo sido isolados, a partir de ecossistemas naturais, microrganismos com capacidade para degradar estes compostos químicos. O sucesso da biorremediação está dependente, em parte, da compreensão dos factores ambientais responsáveis pela manutenção da biodiversidade e da capacidade em “manipular” esta diversidade de forma a melhorar ou a estimular a sua capacidade de degradação dos xenobióticos do solo. Estudos sobre o processo de biodegradação de alguns pesticidas referem que este pode ser mais rápido nos solos que tenham sido submetidos a aplicações repetidas desses compostos, devido a uma especialização do microbiota presente nesses solos.

Existem poucos estudos sobre a degradação do metalaxil e do folpete no ambiente e observa-se uma grande variabilidade de resultados consoante o local onde os ensaios são efectuados. A distribuição e a persistência do metalaxil e do folpete nos ecossistemas parecem ser influenciadas, essencialmente, por factores bióticos, ou seja pela presença de populações microbianas aptas para os biodegradar, embora estes compostos, em particular o folpete, possam também sofrer degradação abiótica. De uma forma geral, os estudos descritos foram efectuados com estirpes puras e em meio aquoso, pouco se sabendo da dinâmica da degradação por populações mistas residentes e/ ou enriquecidas dos solos. Em Portugal, não existem estudos sobre o processo de degradação destes fungicidas no solo, pelo que, neste trabalho fomos isolar e seleccionar microrganismos com capacidade para biodegradar estes fungicidas.

Objectivos

Foram objectivos principais do presente trabalho identificar, seleccionar e caracterizar estirpes fúngicas, isoladas a partir de solos agrícolas, que apresentem capacidade para degradar os fungicidas **metalaxil** e **folpete** em amostras de solo e que poderão, posteriormente, ser utilizadas no processo de biorremediação de solos contaminados.

Como a prática continuada de uma cultura e a aplicação repetida de um pesticida pode levar a uma especialização da população residente, os estudos iniciaram-se com amostras de três solos agrícolas do Alto Alentejo, que apresentavam diferentes níveis de exposição a um fungicida comercial que contém na sua formulação metalaxil (10% p/p) e folpete (40% p/p). Dois dos solos em estudo são de cultura da vinha e diferem entre si no número de tratamentos desta cultura com o fungicida comercial e o outro solo é destinado a culturas sazonais de cereais (milho, trigo, aveia) e nas suas culturas nunca foram aplicados estes fungicidas.

Para o presente estudo, e tendo em vista os objectivos a atingir, elaborou-se o plano de trabalho:

- ✓ Avaliação da capacidade de biodegradação do metalaxil e do folpete pela população residente dos três solos em estudo e determinação do perfil microbiano dos habitats.
- ✓ Selecção, identificação e caracterização de estirpes, isoladas a partir do solo com maior capacidade de biodegradação, que apresentem capacidade para

tolerar concentrações elevadas dos fungicidas após terem sido submetidos a ensaios de enriquecimento selectivo.

- ✓ Identificação da estirpe *Gongronella* sp., utilizando técnicas moleculares de MSP-PCR, por comparação dos perfis electroforéticos obtidos para a estirpe isolada e para duas estirpes padrão (*G. butleri* e *G. lacrispora*).
- ✓ Caracterização molecular das estirpes *Gongronella* sp. e *Rhizopus stolonifer* isoladas antes e após o processo de selecção por comparação dos respectivos perfis electroforéticos obtidos por MSP-PCR.
- ✓ Avaliação da capacidade de biodegradação dos microrganismos seleccionados, em meio aquoso, na presença de quantidades crescentes de metalaxil ou de folpete, com determinação das taxas de degradação dos fungicidas e das taxas de crescimento dos microrganismos.
- ✓ Determinação dos parâmetros cinéticos do crescimento das estirpes *Gongronella* sp. e *Rhizopus stolonifer*, em meio aquoso, na presença de metalaxil como única fonte de carbono.
- ✓ Avaliação da capacidade de degradação do metalaxil pelas estirpes obtidas por enriquecimento selectivo, quando adicionadas a amostras de solo com este fungicida, na presença e na ausência da população residente desses solos.
- ✓ Determinação do oxigénio consumido na presença de quantidades crescentes de metalaxil para avaliação do perfil de crescimento de *Gongronella* sp. e *Rhizopus stolonifer* em solos contaminados com metalaxil.

Estrutura da dissertação

O trabalho apresentado nesta dissertação encontra-se dividido em seis capítulos principais.

No **capítulo 1**, apresentam-se os fundamentos teóricos sobre o papel e interação dos fungicidas com os seres vivos e seu impacto ambiental. São abordados alguns dos problemas que se levantam com a utilização de fungicidas, como a sua eficiência, especificidade e probabilidade de atingir organismos “não-alvo” e, ainda, o seu comportamento e distribuição no ambiente. Referem-se alguns aspectos bioquímicos e toxicológicos relacionados com a capacidade que os seres vivos têm para biotransformar os fungicidas e possíveis efeitos tóxicos destes xenobióticos ou dos seus metabolitos sobre esses organismos.

Descrevem-se também os principais processos de degradação a que estes fungicidas poderão estar sujeitos no ambiente e que, conjuntamente com os processos físicos de transferência, adsorção e mobilidade, poderão influenciar a sua persistência e toxicidade nos ecossistemas. Por último, faz-se uma breve referência às principais técnicas de biorremediação do solo e possíveis aplicações.

No **capítulo 2**, são apresentadas as metodologias utilizadas para proceder à caracterização físico-química e microbiológica de amostras de solos e à avaliação do perfil de biodegradação dos fungicidas metalaxil e folpete pela população microbiana desses solos. Este capítulo inclui o estudo de degradação do metalaxil e do folpete por populações microbianas mistas em amostras de três solos com diferentes níveis de

exposição a estes fungicidas e, ainda, os estudos efectuados com o objectivo de identificar qual dos dois microbiota (bactérias ou fungos) participou mais activamente na degradação destes fungicidas.

No **capítulo 3**, apresenta-se toda a estratégia utilizada para a selecção das duas estirpes estudadas mais resistentes ao metalaxil e ao folpete. São descritos os ensaios de enriquecimento selectivo e de confirmação em meio sólido a que foram submetidos os fungos isolados a partir das amostras do solo que apresentou maior capacidade de biodegradação com vista ao isolamento de estirpes resistentes ao metalaxil.

Neste capítulo, descreve-se também o processo de identificação e caracterização de um dos microrganismos seleccionados, após indução da esporulação. São também descritos os procedimentos de análise molecular, por análise de MSP - PCR ("Microsatellite Primed - PCR"), utilizados para comparar o perfil da estirpe identificada como *Gongronella* sp. com as duas estirpes padrão conhecidas (*Gongronella butleri* e *G. lacrispora*) e também para efectuar o estudo comparativo, a nível molecular, das duas estirpes seleccionados (*Gongronella* sp. e *Rhizopus stolonifer*) antes e após o processo de enriquecimento selectivo.

No **capítulo 4**, descreve-se o processo de avaliação da degradação e toxicidade para cada um dos fungicidas, metalaxil e folpete, em solução aquosa para as estirpes de *Gongronella* sp. e de *Rhizopus stolonifer*. São apresentados os estudos de degradação dos fungicidas pelas estirpes seleccionadas na presença e ausência de uma fonte adicional de carbono com determinação da biomassa.

São também descritos os estudos de crescimento das estirpes *Gongronella* sp. e de *Rhizopus stolonifer* na presença de metalaxil e avaliação do comportamento do metalaxil como substrato inibitório para as duas estirpes em estudo.

No **capítulo 5**, descrevem-se os estudos efectuados para avaliar a capacidade de degradação do metalaxil no solo pelos fungos seleccionados na presença e na ausência da população residente do solo e os estudos periódicos de avaliação qualitativa e semi-quantitativa dos microrganismos presentes, no momento da quantificação do metalaxil.

São também descritos os estudos cinéticos da quantificação da biomassa formada em solos na presença de metalaxil como única fonte de carbono através da determinação das taxas de consumo de oxigénio, tendo sido calculados os parâmetros cinéticos de toxicidade para as espécies *Gongronella* sp. e *Rhizopus stolonifer*.

No **capítulo 6**, são apresentadas as principais conclusões e são apontadas algumas sugestões de trabalho futuro.

CAPÍTULO 1

Aspectos gerais da interacção entre os fungicidas, os seres vivos e o ambiente

1.1. INTRODUÇÃO

Nos últimos 50 anos, na região mediterrânica, tem-se observado um desenvolvimento do sector agrícola. Apesar das múltiplas vantagens para a economia, é importante ter presente os possíveis efeitos adversos resultantes das práticas agrícolas, tais como, a erosão, a salinização, a redução da matéria orgânica e a utilização de pesticidas e aditivos como fontes de poluição não localizadas, que poderão contribuir para uma degradação da qualidade do solo e das reservas de água, com a consequente ameaça para os ecossistemas e seres vivos (Zhang *et al.*, 2000; Zalidis *et al.*, 2002).

A utilização de pesticidas (incluindo herbicidas, insecticidas e fungicidas) na protecção das culturas agrícolas é uma prática usual. A literatura refere, frequentemente, a presença de níveis residuais de pesticidas e de produtos da sua degradação em frutas e vegetais onde são aplicados, em solos, águas superficiais e subterrâneas e, inclusive, em águas potáveis, pondo em risco os ambientes naturais e a saúde pública (Businelli *et al.*, 1984; Legrand *et al.*, 1991; Weber, 1994; Carter & Heather, 1995; Smith, 1995; Guzzella *et al.*, 1996; Di & Aylmore, 1997; Williams *et al.*, 1998; Aylmore & Di, 2000; Cabras & Angioni, 2000; Zhang *et al.*, 2000; Navarro *et al.*, 2001).

A distribuição e o destino dos pesticidas nos ecossistemas são influenciados pelas propriedades físico-químicas destes xenobióticos, composição do solo, condições hídricas e geológicas da área onde são aplicados e factores climáticos (Arnold & Briggs, 1990; Moorman, 1994; Weber, 1994). Quando os pesticidas são aplicados no ambiente, há todo um conjunto de transferências e processos de transformação que controlam a sua persistência nos vários compartimentos ambientais (**Figura 1.1**). Os processos de transferência incluem perdas do solo por volatilização para a atmosfera, absorção e retenção pelas plantas, retenção pelos colóides do solo ou dos sedimentos aquáticos, lixiviação nos solos e movimento através do solo em águas de escoamento e em sedimentos, com possibilidade de contaminação dos ecossistemas aquáticos. Os processos de degradação dos pesticidas incluem as transformações químicas, devidas à interacção do ambiente com os seus grupos funcionais, e as transformações biológicas resultantes da acção de seres vivos nomeadamente de microrganismos bem como os processos de biotransformação por plantas, aves e mamíferos (Racke, 1990a; Roberts, 1990; Weber 1995).

A possível toxicidade dos pesticidas para os animais e para o Homem exige a nossa atenção constante, na medida em que estes compostos, por si só e/ou os produtos provenientes da sua degradação no ambiente ou da sua biotransformação pelos

organismos, poderão causar problemas ambientais sobre os ecossistemas em que circulam e nos seres vivos (Campbell & Langford, 1991). Também a bioacumulação é um tema de interesse na medida em que baixas concentrações de pesticida absorvido ou ingerido podem acumular-se nos organismos dos ecossistemas aquáticos ou terrestres e serem tóxicos não só para esses organismos como também para outros que estejam num nível trófico superior (Ferrando *et al.*, 1996).

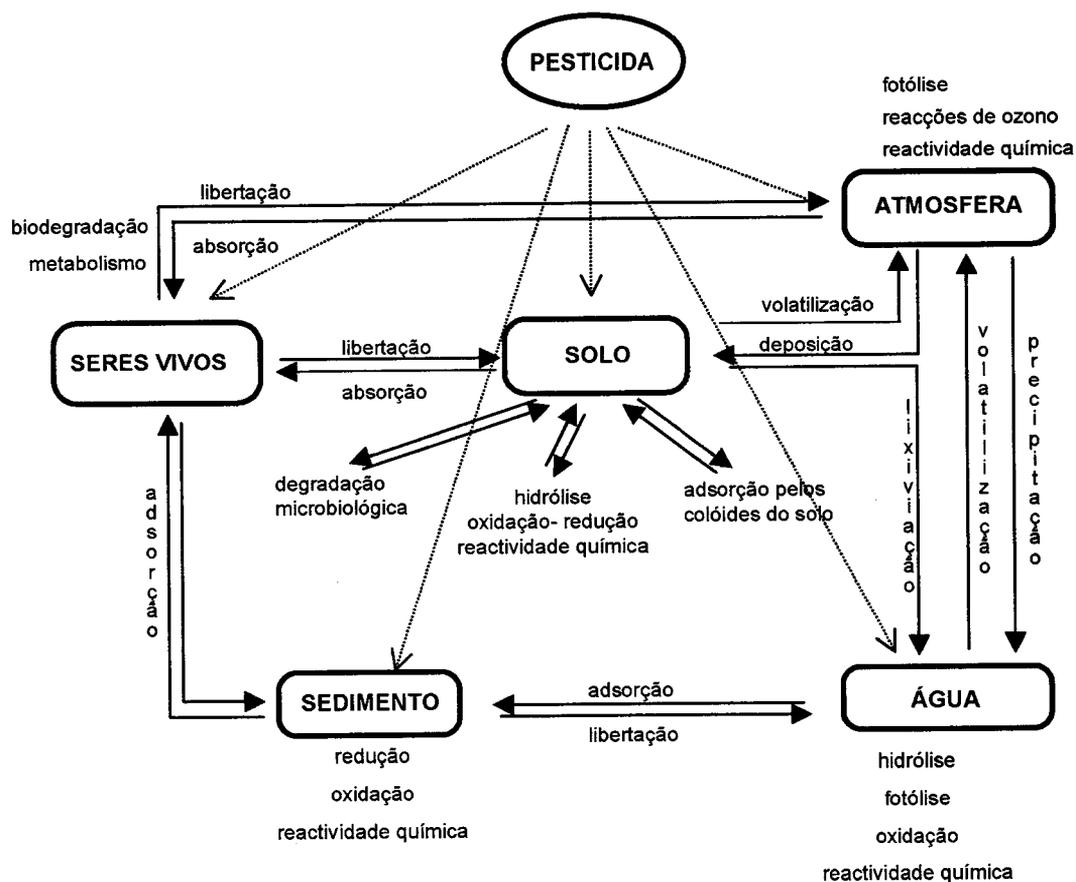


Figura 1.1 - Principais processos de transporte e de transformação dos pesticidas nos vários compartimentos ambientais (adaptado de Cerejeira, 1993).

Tendo presente o impacto que a utilização dos pesticidas pode causar nos organismos e no ambiente, cada vez mais se observa uma tendência para restringir a sua aplicação e utilizar estes compostos de acordo com as práticas de protecção integrada (Amaro, 1991; Ribeiro & Gonçalves, 2000). Em Portugal, os critérios para a escolha de substâncias activas aconselhadas para aplicação na cultura da vinha são estabelecidos pela Portaria 65/97 de 28 de Janeiro, que define e regula os métodos de produção e protecção integrada das culturas adequados à salvaguarda do ambiente e pelo DL 101/2002 de 12 de Abril que estabelece as normas técnicas para a homologação dos produtos fitofarmacêuticos.

No entanto, mesmo quando utilizados nas condições recomendadas, os fungicidas, como aliás a maioria dos pesticidas, são substâncias que tendem a acumular-se nos ecossistemas, com os seus possíveis efeitos nefastos como poluentes terrestres, aquáticos ou atmosféricos. Como as principais reacções de decomposição dos pesticidas são de origem biótica, a biodegradação por microrganismos é considerada como a principal via de degradação destes xenobióticos e de reduzir a sua persistência nos ecossistemas (Racke, 1990a; Walker & Welch, 1990; Eke *et al.*, 1996).

Apesar da tentativa de produzir fungicidas cada vez mais selectivos para os fitopatogénicos, a utilização destes compostos pode levar à destruição de grande parte da população microbiana activa no seu processo de biodegradação e, conseqüentemente, aumentar a sua acumulação nos solos, pelo que se torna importante seleccionar microrganismos com capacidade para degradar concentrações relativamente elevadas destes compostos (Aharason *et al.*, 1990).

A adaptação de microrganismos para a biodegradação dos fungicidas e outros pesticidas é um fenómeno que pode ocorrer quando estes compostos, em certas concentrações, contactam com populações microbianas do solo capazes de os degradar.

Geralmente, esses microrganismos adaptaram-se aos fungicidas após aplicação prévia desse composto químico ou similar e desenvolveram mecanismos enzimáticos capazes de os degradar mais facilmente. Este fenómeno é denominado biodegradação facilitada (“enhanced biodegradation”) e consiste no aumento das taxas de biodegradação de um fungicida no solo, por microrganismos que estiveram previamente em contacto com esse xenobiótico, que se adaptaram à sua presença e que desenvolveram capacidade para o degradar (Racke, 1990a; Martin *et al.*, 1995, 1999).

A biorremediação é uma das estratégias de descontaminação do ambiente muito utilizada no tratamento de resíduos biológicos para destruir ou reduzir, pela acção de microrganismos, a concentração de despejos nocivos de um local contaminado. Nas práticas de biorremediação, especialmente para o tratamento *in situ*, podem utilizar-se microrganismos do solo que se adaptaram previamente a um xenobiótico e que, após exposição prévia, adquiriram capacidade para o degradar mais rapidamente (Racke, 1990b; Newcombe & Crowley, 1999).

1.2. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS FUNGICIDAS

As propriedades físico-químicas dos fungicidas, como já referimos, influenciam a sua distribuição e a sua persistência no ambiente. A presença de grupos funcionais e de outros grupos na estrutura química dos fungicidas condiciona o estado de ionização, a polaridade e a reactividade destes compostos e, conseqüentemente, a sua estabilidade nos diversos ecossistemas (Hassall, 1990; Roberts, 1990). Para além da natureza química, temos ainda a considerar outros factores que condicionam a acumulação dos fungicidas no ambiente, tais como, a solubilidade na água, a pressão de vapor, a

capacidade de adsorção aos colóides do solo e sedimentos, os coeficientes de partição, a mobilidade e a lixiviação nos solos (Arnold & Briggs, 1990; Hassall, 1990).

A volatilização é um importante processo de remoção física dos fungicidas (Taylor & Spencer, 1990; Racke, 1990a). A pressão de vapor, directamente proporcional à volatilidade das substâncias e inversamente proporcional à sua solubilidade em água, controla a dispersão dos fungicidas a partir do seu local de aplicação (Miyamoto *et al.*, 1990).

A formulação comercial que associa os fungicidas metalaxil e folpete é frequentemente utilizada para protecção das culturas da vinha contra o mildio (*Plasmopara viticola*) (Júlio, 2001).

O **Metalaxil** ou N-(2,6-dimetilfenil)-N-metoxiacetil-DL-alaninato de metilo (**Figura 1.2**) pertence ao grupo dos fungicidas fenilamidas conjuntamente com o benalaxil e o fluralaxil (Tomlin, 1995). As características gerais do metalaxil estão representadas na **tabela 1.1**.

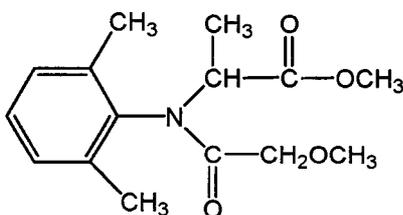


Figura 1.2 - Estrutura química do metalaxil: N-(2,6-dimetilfenil)-N-metoxiacetil-DL-alaninato de metilo.

Tabela 1.1 - Características físico-químicas do metalaxil (Tomlin, 1995; Merck & Co., 1996).

Nome	IUPAC	N-(2,6-dimetilfenil)-N-metoxiacetil-DL-alaninato de metilo
	CAS	Metil N-(2-metoxiacetil)-N-(2,6 xilil)-DL-alaninato
Classe Química		Acilalanina
Formula Molecular		$C_{15}H_{21}NO_4$
Massa Molar		279, 34 g/mol
Ponto de fusão		71-72 °C
Pressão de vapor		$2,2 \times 10^{-6}$ mm Hg (20°C) ou 75×10^{-5} Pa (25°C)
Coeficiente de partição octanol-água (log P_{ow})		1,75
Solubilidade em água		7,1 g .L ⁻¹ (20°C)
Solubilidade em solventes orgânicos (25°C)		Solúvel em diclorometano (770 g.L ⁻¹), metanol (650 g.L ⁻¹), benzeno (550 g.L ⁻¹), acetona (450 g.L ⁻¹) e etanol (400 g.L ⁻¹). Pouco solúvel em n-octanol (68 g.L ⁻¹) e n-hexano (11 g.L ⁻¹)
Estabilidade		Estável a temperaturas inferiores a 300°C. Estável à esterilização por calor húmido em autoclave. Estável em meios neutros ou ácidos, à temperatura ambiente.

O **Folpete** ou N-triclorometiltioftalimida (**Figura 1.3**) pertence ao grupo dos fungicidas N-triclorometiltioderivados, como a captana e o captafol (Tomlin, 1995). As características gerais do folpete estão representadas na **tabela 1.2**.

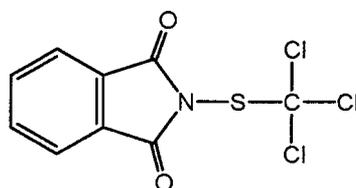


Figura 1.3- Estrutura química do folpete: N-triclorometiltioftalimida.

Tabela 1.2 - Características físico-químicas do folpete (Tomlin, 1995; Merck & Co., 1996)

Nome	IUPAC	N-triclorometiltioftalimida
		N-triclorometilsulfanilftalimida
		N-triclorometilsulfanil-1,2-benzenocarboximida
	CAS	2-[(triclorometil)tio]-1H-iso-indol-1,3(2H)-diona
Classe Química		Ftalimida
Formula Molecular		$C_9H_4Cl_3NO_2S$
Massa Molar		$296,56 \text{ g.mol}^{-1}$
Ponto de fusão		177°C
Pressão de vapor (25°C)		$1,6 \times 10^{-7} \text{ mmHg}$ ou $2,1 \times 10^{-5} \text{ Pa}$
Coefficiente de partição octanol-água ($\log P_{ow}$)		3,11 à temperatura de 25°C
Solubilidade em água		Muito baixa ($1,3 \text{ mg.L}^{-1}$ a 25°C)
Solubilidade em solventes orgânicos (25°C)		Relativamente solúvel em acetona, acetonitrilo, clorofórmio ($8,7 \text{ g.L}^{-1}$), benzeno ($2,2 \text{ g.L}^{-1}$) e isopropanol ($1,25 \text{ g.L}^{-1}$) a 20°C . Pouco solúvel em cetonas alifáticas (3 a 4%), hidrocarbonetos alifáticos (0.1 – 1%) e insolúvel em hidrocarbonetos aromáticos, polares e oxigenados.
Estabilidade		Estável no ambiente em condições de baixa humidade. Não é estável em condições alcalinas.

1.3. OS FUNGICIDAS E OS FUNGOS FITOPATOGÉNICOS

Os fungicidas são substâncias químicas com capacidade para eliminar fungos, sendo frequentemente utilizados na protecção das culturas contra os fungos fitopatogénicos. Um dos principais problemas associados ao controlo destes microrganismos relaciona-se com a grande facilidade que os micélios possuem para se regenerar a partir de algumas hifas e a resistência devida à formação de estruturas como clamidósporos e esporos (Hassall, 1990).

Consoante o seu processo de interacção com os fitopatogénicos, os fungicidas podem ser divididos em dois tipos:

- ◆ **fungicidas sistémicos** - penetram na planta (quer através das raízes quer através da folha) e são transportados pelo xilema ou pelo floema, até ao local onde poderão exercer a sua acção.
- ◆ **fungicidas não sistémicos ou de contacto** - permanecem perto do ponto onde foram depositados.

Os fungicidas sistémicos são absorvidos pelas plantas, penetram no interior dos tecidos e podem erradicar a doença, no entanto, quando não são muito específicos podem afectar irreparavelmente o crescimento da planta (Hassall, 1990; Cremllyn, 1991).

Os fungicidas não sistémicos têm predominantemente uma acção por contacto, quando depositados na superfície da planta, conferem protecção inibindo o crescimento do fungo e limitando a produção de estruturas reprodutoras, evitando a germinação dos esporos. Esta acção retarda ou previne a doença, no entanto, a maioria destes compostos são mais efectivos antes do início da infecção da planta. Os fungicidas não sistémicos devem possuir um certo grau de persistência e a maioria deles são insolúveis em água para evitar que sejam facilmente arrastados pela chuva (Hassall, 1990; Cremllyn, 1991).

A aplicação excessiva de fungicidas levou à formação de espécies de parasitas resistentes, pelo que é cada vez mais importante a utilização cuidada destes fitofármacos.

Os fungos fitopatogénicos dividem-se, frequentemente, consoante a sua principal via de infecção (ar, sementes ou solo), sendo considerados três grupos principais: os fungos que infectam as partes aéreas das plantas, os que infectam as plantas pela raiz e, ainda, aqueles que se reproduzem nas sementes das plantas, como se apresenta na **tabela 1.3** (Hassall, 1990; Cremlyn, 1991).

1.3.1. Principais aplicações dos fungicidas Metalaxil e Folpete

O metalaxil é um fungicida muito utilizado que possui actividade residual e sistémica contra os fungos Oomycetes, especialmente os pertencentes à Ordem Peronosporales, que são causadores de míldio nas culturas, como por exemplo, *Bremia* sp., *Phythium* sp. (trigo, aveia, cana-de-açúcar), *Phytophthora* sp. (batata, tomate e outros vegetais), *Pseudoperonospora cubensis* (melão, pepino e outros), *Peronospora tabacina* (tabaco), *Sclerospora* sp. e *Plasmopara viticola* (míldio da videira) (Kerkenaar & Sijpesteijn, 1981; Brantner & Windels, 1995; O'Brein & Weinert, 1995; Sharma & Awasthi, 1997; Matheron & Porchas, 2000).

O metalaxil é comercializado como uma mistura racémica de enantiómeros R e S. O enantiómero R também é comercializado desde 1996 pelo nome de Mefenoxam ou Metalaxil-M (Nuninger *et al.*, 1996; Zadra *et al.*, 2002).

As associações têm a vantagem de alargar o espectro de acção dos fungicidas e, simultaneamente, de diminuir ou até mesmo de evitar a capacidade de adaptação das estirpes fúngicas (Cremlyn, 1991).

Tabela 1.3 – Classificação dos fungos patogênicos de acordo com a sua principal via de infecção nas plantas e referência aos fungicidas mais eficazes (adaptado de Hassall, 1990).

Fungos das partes aéreas das plantas	
Grupo I	<p>Fungos que produzem esporos livres móveis (zoósporos) e que necessitam de água para se propagarem (transmissão por via aquosa). A infecção, é portanto, favorecida em condições de elevada humidade.</p> <p>A Principalmente fungos do grupo dos Oomicetes, em particular os da ordem Peronosporales que são causadores de míldio nas culturas (<i>Phythium</i> sp., <i>Phytophthora</i> sp., <i>Peronospora</i> sp. e <i>Plasmopara viticola</i> (míldio da videira).</p> <p>Fungicidas: ftalimidas (folpete e análogos), acetamidas (metalaxil), ditiocarbamatos, óxidos de cobre, etc.</p>
	<p>Fungos que não possuem esporos móveis mas que também são transmitidos por via aquosa. A infecção na planta é, geralmente, favorecida na presença de água, que transporta os esporos por arrastamento ou na qual vão suspensos.</p> <p>B Engloba várias divisões taxonómicas de fungos, nomeadamente alguns Ascomicetes e alguns Deuteromicetes.</p> <p>Ex.: <i>Botrytis cinerea</i> Pers (podridão cinzenta da vinha).</p> <p>Fungicidas: ftalimidas (folpete), diclofuanida, benzimidazóis, etc.</p>
Grupo II	<p>Os esporos são transmitidos por via aérea e a infecção é favorecida em condições de baixa humidade. O micélio, frequentemente hidrofóbico cresce na superfície da folha.</p> <p>Inclui patogênicos do grupo dos Ascomicetes.</p> <p>Ex: <i>Uncinula necator</i> e outros responsáveis pelo oídio.</p> <p>Fungicidas: ftalimidas (folpete), hidroxipirimidinas, derivados azólicos.</p>
Fungos das sementes	
	<p>Alguns fungos vivem à superfície das sementes, outros vivem dentro delas. Fungos pertencentes às mais diversas ordens. Inclui alguns Basidiomicetes (ex. <i>Ustilago</i>), alguns Ascomicetes (ex. <i>Pyrenophora</i>) e alguns Deuteromicetes (ex. <i>Steptoria</i>).</p> <p>Fungicidas: carboxamidas, derivados azólicos, ditiocarbamatos, óxidos de cobre, organomercúricos, etc.</p>
Fungos do sistema radicalar	
	<p>A infecção transmite-se através do solo. Fungos pertencentes a muitos grupos taxonómicos, inclui Oomicetes (ex. <i>Phythium</i> sp.), Deuteromicetes (ex. <i>Fusarium</i> sp.) e Basidiomicetes (ex. <i>Urocystis</i> sp.).</p> <p>Fungicidas: benzimidazóis, derivados aromáticos cloro-substituídos, sais de cobre, etc.</p>

Geralmente, obtêm-se melhores resultados quando se associa um fungicida sistémico a um fungicida de contacto sendo bastante frequente a associação do metalaxil com outros fungicidas, como óxidos de cobre, ditiocarbamatos (mancozebe, tiabendazole) e ftalimidas, como o folpete (Fontem & Aighewi, 1993).

O **folpete** é um fungicida de contacto de largo espectro pertencente à família das ftalimidas. É um importante protector da superfície das plantas utilizado no controlo de fitopatogénicos que infectam as partes aéreas das plantas (Cremllyn 1991). A sua utilização pode ser muito variada, podendo ser aplicado em várias culturas, nomeadamente nas culturas de batata, cebola, feijão, tomate, morango e vinha (Sobreiro & Reis, 2000). Tem uma acção preventiva e protectora anti-míldio (*Plasmopara viticola*), anti-oidio (*Uncinula necator*) e anti-podridão cinzenta (*Botrytis cinerea*) (Tomlin, 1995).

Estudos actuais com o folpete realçam a sua polivalência e a importância preventiva e protectora contra várias doenças da vinha, em particular as provocadas por *Plasmopara viticola*, *Phomopsis viticola* e *Coniothyrium dipodiella* referindo também uma eficácia colateral no combate à *Botrytis cinerea* e, em parte, no combate à *Uncinula necator* e a *Guignardia bidwellii* (Gualco & Toni, 2001).

1.3.2. Mecanismos de acção dos fungicidas

Muitos fungicidas com diferentes mecanismos de acção foram desenvolvidos e comercializados nas últimas décadas (Cremllyn, 1991; Kaneko *et al.*, 1995). A sua acção contra os fitopatogénicos pode manifestar-se a vários níveis, nomeadamente:

- (1) inibição de processos bioquímicos dos fungos, tais como, a biossíntese de ácidos nucleicos, aminoácidos ou de proteínas ou, ainda, inibição da biossíntese de lípidos, nomeadamente dos esteróides e ácidos gordos;

- (2) perturbações do metabolismo energético, tais como inibição da glicólise, do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, da cadeia transportadora de electrões ou da fosforilação oxidativa;
- (3) inibição da divisão celular ou destruição das estruturas celulares, nomeadamente por atrofia do crescimento das hifas e inibição da formação de estruturas produtoras de esporos (Kaneko *et al.*, 1995).

Alguns dos fungicidas actualmente mais utilizados são inibidores da biossíntese de esteróides dos fitopatogénicos (triazóis e derivados da morfolina), inibidores da síntese proteica (ftalimidas) ou da biossíntese dos ácidos nucleicos, como as acilalaninas que inibem a síntese do RNA e os benzimidazóis que foram inicialmente considerados como inibidores da síntese do DNA e, posteriormente, como inibidores da formação dos microtubulos nos microrganismos (Cremllyn, 1991; Kaneko *et al.*, 1995).

O **metalaxil** possui propriedades sistémicas e actua por inibição da biossíntese do RNA ribossomal dos fungos da ordem Peronosporales. A sua eficácia resulta da inibição específica da RNA polimerase-1 e da inibição da ligação da uridina no rRNA por interferência ao nível da transcrição (Cremllyn, 1991; Brantner & Windels, 1998; Molina *et al.*, 1998). Apesar do modo de acção primário do metalaxil parecer ser a inibição da síntese do RNA ribossomal, este fungicida também intervém no processo de esporulação dos fitopagénicos. Estudos efectuados durante o processo de germinação de *Plasmopara vitícola* mostraram que o metalaxil parece interferir com os processos de formação e maturação dos zoósporos (Madden & Ellis, 2000). Estudos efectuados em *Phytophthora* sp. mostraram que o metalaxil inibe o crescimento do micélio com inibição da formação do esporângio e que, por vezes, reduz a duração da mobilidade do zoósporo, reduzindo a dispersão e a sua capacidade de germinação (Materon & Porchas, 2000).

O **folpete** é um fungicida de contacto de largo espectro. A sua acção é principalmente preventiva, actuando essencialmente por desnaturação dos grupos tiol (SH) das proteínas, como inibidor da germinação dos esporos dos fungos e do crescimento do micélio (Cremllyn, 1991; EPA, 1999a; Gualco & Togni, 2001). No seu modo de acção podem distinguir-se, fundamentalmente, três mecanismos principais: inibição específica da respiração, interferência na permeabilidade da membrana e acção sobre a divisão celular. O folpete reage com o grupo tiol presente em diversos enzimas da cadeia respiratória e da membrana celular, formando pontes dissulfureto que alteram o fluxo electrónico mitocondrial e, conseqüentemente, bloqueiam a respiração e a permeabilidade da membrana citoplasmática e inibem o processo normal de divisão celular (Gualco & Togni, 2001).

1.4. INTERACÇÃO DOS FUNGICIDAS COM OS MICRORGANISMOS NÃO FITOPATOGÉNICOS

Os microrganismos do solo apresentam uma grande biodiversidade e desempenham um papel fundamental na decomposição dos fungicidas. Para além disso, são essenciais para a fertilidade dos solos, na medida em que são os responsáveis pela fixação do azoto e conversão dos resíduos orgânicos em formas assimiláveis pelas plantas (Novack *et al.*, 1995). As bactérias do solo são particularmente importantes, não só porque participam na decomposição de compostos orgânicos e na formação do húmus, mas também porque algumas delas participam na biossíntese e catabolismo do fosfato. Outras, ainda, têm a capacidade de fixar o azoto (bactérias fixadoras de azoto), e transformar azoto amoniacal em ácido nítrico ou nitroso (bactérias nitrificantes). Os fungos são os principais decompositores da matéria orgânica do solo, nomeadamente

dos polímeros de linhina e dos complexos de ácidos húmicos. São, geralmente, mais tolerantes à acidez do que as bactérias, pelo que a decomposição da matéria orgânica em solos mais ácidos é, normalmente, devida aos fungos. As algas, os protozoários e a microfauna também fazem parte dos componentes vivos do solo, no entanto, a sua intervenção na biorremediação do solo não tem despertado tanto interesse (Correia, 1982; Novack *et al.*, 1995; Coleman & Crossley, 1996).

Do mesmo modo, os microrganismos desempenham um importante papel nos ecossistemas aquáticos, quer na conversão de compostos orgânicos provenientes da flora e fauna do meio, quer na decomposição de compostos orgânicos poluentes como os fungicidas. À semelhança dos microrganismos terrestres, os microrganismos aquáticos são importantes para a fixação do azoto, para a nitrificação e para a biossíntese e catabolismo do fosfato. As bactérias e fungos do meio aquático são os principais intervenientes no processo de transformação da matéria orgânica com formação de sais oxidados, tais como nitratos, sulfatos e fosfatos (Pritchard & Bourquin, 1985).

1.4.1. Degradação microbiana dos fungicidas

Alguns microrganismos conseguem resistir a concentrações elevadas de um determinado fungicida e, simultaneamente, contribuir para a sua degradação. As transformações mais completas dos fungicidas são mediadas, essencialmente, por microrganismos que desempenham um papel muito importante na biodegradação destes xenobióticos e que determinam o seu destino e persistência no ambiente (Matsumara, 1982; Moorman, 1994; Aislabie & Lloyd-Jones, 1995; Novack *et al.*, 1995).

A quantidade de microrganismos activos existentes nos vários ecossistemas para transformar um determinado fungicida condiciona a sua taxa de biodegradação (Moorman, 1994; Novack *et al.*, 1995). Os fungicidas são substâncias estranhas para os

microrganismos do solo que nem sempre dispõem de sistemas enzimáticos necessários, pelo que o processo de degradação dos fungicidas, como dos outros pesticidas é frequentemente parcial e ocorre por acção de enzimas exo- ou endocelulares pouco específicos. No entanto, a presença do fungicida também pode provocar a indução de enzimas mais ou menos específicos aptos para o degradar, o que se traduz no aumento da capacidade de biodegradação, após exposição mais ou menos prolongada a esse fungicida ou similar, ocorrendo o fenómeno de biodegradação facilitada (Anderson & Lafuerza, 1992; Schiavon & Morel, 1995).

De uma forma geral, a biodegradação dos fungicidas depende da interacção de um conjunto de factores pedoclimáticos que regulam a biodisponibilidade do composto e a biomassa do solo. A biodisponibilidade é resultante dos processos de adsorção-desorção e da formação de resíduos entre os fungicidas e os constituintes do solo, os quais dependem dos conteúdos em argila, matéria orgânica, humidade, pH e temperatura do solo. Simultaneamente, a natureza e o crescimento das populações presentes no solo também são dependentes do pH, do potencial redox, da temperatura, das fontes de energia e dos nutrientes minerais (Aislabie & Lloyd-Jones, 1995; Schiavon & Morel, 1995). A composição do solo, nomeadamente, o conteúdo em matéria orgânica e partículas minerais e humidade, o pH e a temperatura influenciam a proliferação dos microrganismos, os fenómenos de adsorção e desorção às partículas do solo e as suas actividades de biodegradação (Sethunatnan *et al.*, 1982; Schiavon & Morel, 1995).

A taxa de degradação também pode variar com a profundidade dos solos e está correlacionada com a taxa de respiração e com a biomassa microbiana, que também diminuem com a profundidade (Moorman, 1994). A maioria dos microrganismos intervenientes no processo de degradação dos fungicidas são aeróbios, observando-se, normalmente, uma diminuição significativa da degradação dos fungicidas pelos microrganismos em locais onde há baixo teor de oxigénio (Moorman, 1994).

A frequência de aplicação também pode influenciar a biodegradação. Para alguns fungicidas, observa-se que, à medida que aumenta a sua concentração no solo diminui a capacidade dos microrganismos para os degradar podendo atingir concentrações tóxicas no solo (Novack *et al.*, 1995).

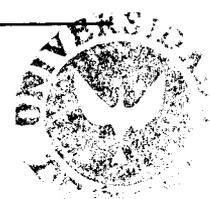
1.4.1.1. Metalaxil

Existem poucos estudos sobre a degradação do metalaxil no ambiente. No entanto, o processo de degradação do metalaxil nos solos parece ser um processo essencialmente biótico e dependente do tipo de solo, da sua composição em biomassa e das condições ambientais (Sharon & Edgington, 1982; EPA, 1994).

A exposição prévia do solo ao metalaxil também parece influenciar o processo de biodegradação. Estudos efectuados em solos submetidos a tratamentos anteriores com metalaxil referem que estes apresentaram maior capacidade para o degradar do que solos similares sem exposição prévia ao fungicida, parecendo estar sujeito à biodegradação facilitada (Bailey & Coffey, 1985, 1986).

A humidade do solo, também influencia a proliferação dos microrganismos activos para degradar o metalaxil. Mohapatra & Awasthi (1997) referem que a utilização de culturas de enriquecimento provenientes de solos inundados degradam o metalaxil mais eficientemente do que culturas provenientes de solos secos, mas, no entanto, não são tão eficientes como culturas provenientes de solos irrigados.

Todavia, o mecanismo de degradação do metalaxil no solo não está ainda esclarecido. Os produtos de degradação, a velocidade de degradação do metalaxil e dos seus resíduos é bastante variável consoante o tipo de solo estudado e a sua localização geográfica (Cremlyn, 1991). Os possíveis intermediários formados no processo de degradação do metalaxil no solo, descritos na bibliografia, são apresentados na **figura**



1.4. Alguns estudos referem que o principal composto formado após aplicação do metalaxil nos solos foi o seu derivado ácido ou N-2,6-dimetilfenil-N-metoxiacetilalanina (percurso (1) da figura 1.4) que, posteriormente, pode ser mineralizado em CO₂ (Bailey & Coffey, 1986; EPA, 1994). Um outro estudo de degradação do metalaxil refere que o composto que foi predominantemente encontrado nos solos foi o derivado formado por hidroxilação do grupo metilo ligado ao anel benzênico (percurso (2) da figura 1.4) que, posteriormente, foi mineralizado em CO₂ (Wang *et al.*, 1995).

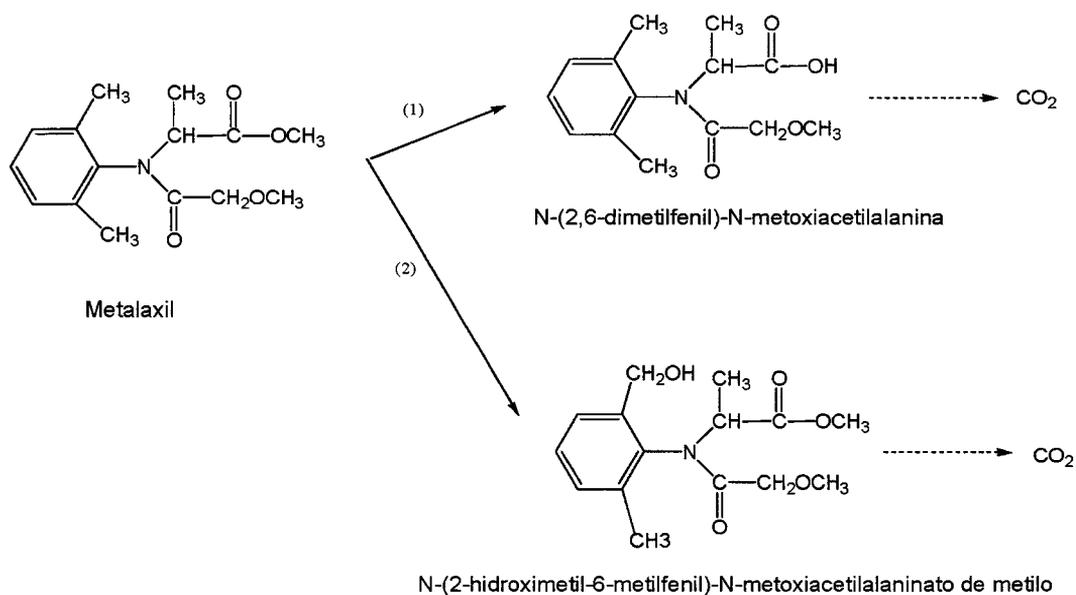


Figura 1.4 – Possíveis intermediários formados no processo de degradação do metalaxil no solo (1) EPA, 1994, (2) Wang *et al.*, 1995.

1.4.1.2. Folpete

Há poucos estudos sobre a degradação do folpete no ambiente. Em soluções aquosas e em meios alcalinos, o folpete degrada-se rapidamente, obtendo-se como principal produto a ftalimida como se apresenta na **figura 1.5** (Viviane-Nauer *et al.*, 1997a). Nos ecossistemas, o desaparecimento do folpete parece estar simultaneamente dependente das hidrólise abiótica e da degradação microbiana. O folpete é biodegradado no solo com formação de ftalimida e de CO₂, sendo este o produto predominante (Sisler, 1982; EPA, 1999a).

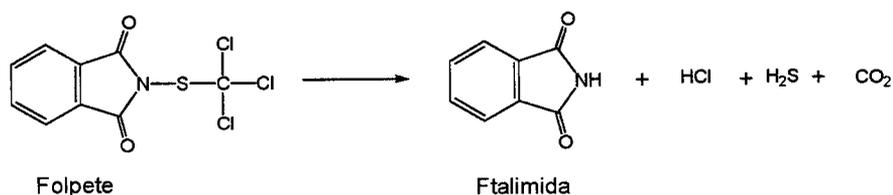


Figura 1.5 – Degradação do folpete em solução aquosa (Viviane-Nauer *et al.*, 1997a).

1.4.2. Toxicidade para os microrganismos

Com o desenvolvimento da indústria dos produtos fitofarmacêuticos, os fungicidas tendem a ser cada vez mais específicos para os agentes patogênicos, no entanto, muitos destes produtos químicos podem ser tóxicos para alguns microrganismos importantes dos ecossistemas terrestres e aquáticos.

Apesar de uma parte da população microbiana existente nestes ecossistemas poder desenvolver capacidade para os biodegradar, em concentrações relativamente elevadas, alguns fungicidas poderão inibir o crescimento desses microrganismos aumentando a sua persistência no ambiente (Novak *et al.*, 1995; Taiwo & Oso, 1997).

Alguns estudos de toxicidade referem que a aplicação de fungicidas sulfurados no solo, como o folpete causa um elevado efeito inibitório na actividade da urease e na nitrificação do azoto nos solos e que alguns fungicidas não sulfurados, como o metalaxil, quando aplicados em doses elevadas também podem provocar estes efeitos (Sisler, 1982; Martens & Bremner, 1997). Segundo Monkiédjé *et al.* (2000), a dose e a frequência de aplicação estão correlacionadas com a toxicidade que os fungicidas poderão exercer sobre os microrganismos. Para estes autores, a aplicação de baixas concentrações de metalaxil estimularam o crescimento de bactérias fixadoras de azoto enquanto que a utilização de altas concentrações inibiram o processo de nitrificação.

1.5. INTERACÇÃO DOS FUNGICIDAS COM AS PLANTAS

Quando uma cultura é tratada com um produto fitossanitário, uma certa percentagem de ingrediente activo fica em contacto com a planta. No caso dos fungicidas, a sua deposição depende de um grande número de factores, incluindo: a dose de composto aplicada por hectare, as propriedades químicas, o tipo de formulação, o método de aplicação, a morfologia e a superfície da planta, para além das condições climáticas durante a aplicação. Após a aplicação, a taxa de eliminação do fungicida também é variável consoante as características específicas da planta, a formulação e o método de aplicação, as condições climáticas (vento, chuva) e as propriedades físico-químicas desse fungicida (Navarro *et al.*, 2001).

A degradação dos fungicidas pelas plantas é um meio importante de auto-desintoxicação que, geralmente, diminui a possibilidade de transmissão do composto através da cadeia alimentar. As plantas estão equipadas com sistemas de defesa contra os agentes externos, incluindo os fungicidas, dos quais se destaca um conjunto de processos bioquímicos de conversão dos xenobióticos em metabolitos mais hidrófilos e mais facilmente excretáveis. A degradação dos fungicidas pelas plantas superiores pode envolver um grande número de reacções químicas, muitas delas catalisadas por enzimas específicos. Entre as principais reacções de degradação incluem-se as oxidações catalisadas pelos isoenzimas do sistema citocromo P450 microsomal, descarboxilações, desaminações, desalogenações, desalquilações, hidrólises enzimáticas e não enzimáticas, hidroxilações e conjugações com compostos endógenos, como o glutathione (GSH) e aminoácidos (Hassall, 1990).

Embora a finalidade dos fungicidas seja proteger as plantas contra os fungos fitopatogénicos, quando não são muito específicos, estes compostos podem afectar irreparavelmente o crescimento da planta (Hassall, 1990). Também é importante ter em conta a dose de fungicida aplicado e o prazo de tolerância, pois a presença de resíduos nos alimentos pode ser bastante prejudicial para a saúde. No caso da cultura de vinha, os resíduos de fungicidas nas uvas podem ser prejudiciais não só nas uvas de mesa, como também nas uvas de vinho, nas quais podem passar para o mosto e alterar a qualidade do vinho (Navarro *et al.* 2001).

1.5.1. Metabolismo e toxicidade do metalaxil nas plantas

Como já referimos, o metalaxil é um fungicida sistémico que é absorvido pelas plantas através das folha e caule (aplicação foliar) ou através das raízes e tubérculos (aplicação no solo) e é transportado para vários locais da planta onde possa exercer a sua acção contra o fitopatogénico e erradicar a doença. Estudos efectuados em várias

culturas mostraram que o metalaxil é absorvido, sofre translocação e é extensivamente biotransformado pelas plantas (EPA, 1994).

As diferentes reacções de transformação do metalaxil nas plantas descritas envolvem: a hidrólise das ligações metil-éster e metil-éter e formação do derivado do álcool benzílico, oxidação do grupo metilo ligado ao anel benzénico e formação do álcool benzílico derivado, hidroxilação do anel benzénico e N-desalquilação, com posterior conjugação destes metabolitos com compostos endógenos, como por exemplo a glucose (**Figura 1.6**). A maioria dos derivados do metalaxil foi encontrada em folhas e rebentos de plantas, no entanto, os metabolitos formados parecem variar com o tipo de cultura (Gross, 1986; Cole & Owen, 1987; FAO, 1996). Assim, por exemplo, o produto resultante da oxidação do grupo metilo ligado ao anel benzénico com formação de N-(2-hidroximetil)-6-metilfenil)-N-metoxiacetilalaninato de metilo foi o resíduo predominante detectado em suspensões celulares de culturas de vinha no estudo efectuado por Cole & Owen (1987). Um outro estudo efectuado em uvas refere que cerca de 60% do resíduo dos compostos derivados continha dimetilanilina (FAO, 1996).

É importante salientar que, principalmente, quando o prazo de tolerância exigido após a aplicação do fungicida não é respeitado, os resíduos de fungicidas podem passar para os alimentos ou seus derivados e causar graves riscos para a saúde pública. O DL 215/ 2001 de 2 de Agosto baseado na directiva comunitária 2000/42/EC estabelece que os níveis máximos de resíduos de metalaxil permitidos são de 2 mg/kg nas uvas de mesa e de 1 mg/kg nas uvas para produção de vinho.

Segundo Navarro *et al.* (2001), após a aplicação de metalaxil, na cultura de vinha, nas doses recomendadas, a dissipação do metalaxil foi de 89% ao fim de 28 dias, tendo sido encontrados resíduos nas uvas de 0,1 mg/Kg de metalaxil. O mesmo autor refere ainda que em estudos, efectuados durante seis anos e em vários países, os resíduos

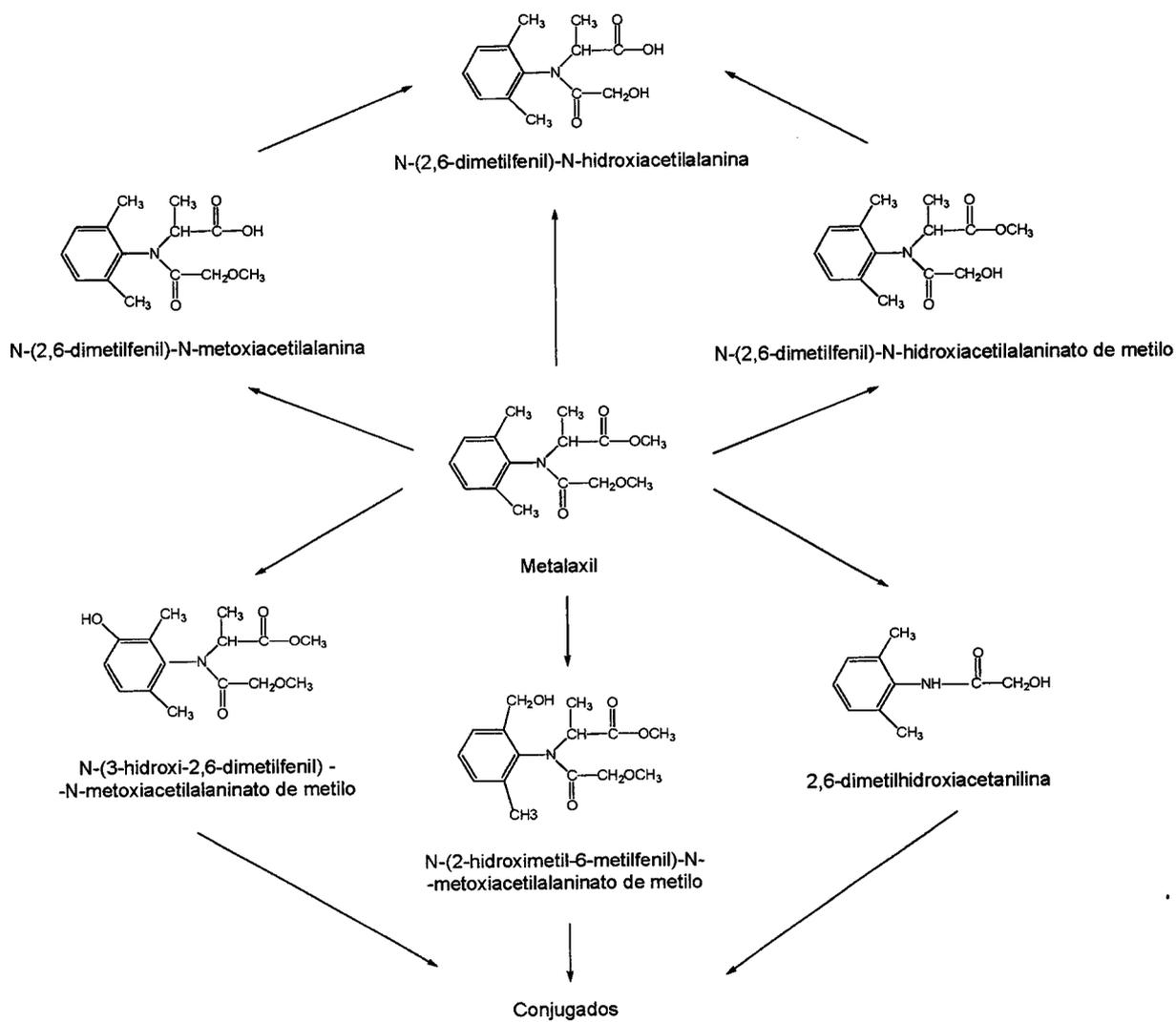


Figura 1.6 - Produtos da degradação do metalaxil detectados em plantas e culturas de tecidos (adaptado de Gross, 1986; Cole & Owen, 1987).

detectados após 28 dias variaram entre 0,06 e 4,40 mg/Kg, tendo os valores menores sido geralmente encontrados em zonas mais secas, pelo que a grande variabilidade na concentração de resíduos pode ser devida às condições climáticas.

1.5.2. Metabolismo e toxicidade do folpete nas plantas

O folpete é um fungicida que exerce a sua acção por contacto e que, devido à sua formulação, que é bastante insolúvel em água, permanece bastante tempo nos locais onde é aplicado (folhas e caule da planta e/ou frutos). Os principais percursos de biodegradação do folpete nas plantas estão representados na **figura 1.7** (FAO/WHO, 1998). Os resíduos de folpete e derivados formados parecem variar bastante com o tipo de cultura. Assim, por exemplo, nas culturas de couve praticamente todo o folpete foi degradado em ftalimida, nas culturas de espinafres cerca de 70 % do folpete foi degradado e nas culturas de abóbora apenas 30% do folpete foi degradado em ftalimida (Akiyama *et al.*, 1998). Estudos em cultura de tomate, com folpete marcado, mostraram que o folpete foi rapidamente absorvido pelas plantas (85 % num dia) e que 11 dias após a aplicação o folpete residual era muito baixo, tendo sido identificados como principais metabolitos a ftalimida, o ácido ftalâmico e o ácido ftálico (EPA, 1999a). Nas culturas de trigo, o folpete foi o produto predominante, tendo sido também detectados ftalimida e ácido ftálico, mas o ácido ftalâmico não foi detectado (FAO/WHO, 1998).

Cabras *et al.* (1997) estudaram a persistência e o metabolismo do folpete em uvas e no vinho. Nas uvas, o composto predominantemente encontrado foi o folpete (2,8 mg/Kg), embora também tenham sido encontradas pequenas quantidades de ftalimida (0,5 mg/Kg). No mosto, embora a ftalimida tenha sido o principal produto de degradação detectado (cerca de 80%) também foram detectadas pequenas quantidades de ácido ftálico, o que levou os autores a concluir que o processo de degradação do folpete não é uma sequência de reacções: ftalimida, ácido ftalâmico, ácido ftálico mas sim uma série de

reações paralelas, com formação, por um lado, de ftalimida e, por outro, de ácido ftalâmico que, posteriormente, se degrada em ácido ftálico (Figura 1.7). As diferenças nos produtos de degradação obtidos em soluções aquosas a pH 7 e no mosto foram atribuídas às diferenças do valor do pH, uma vez que os estudos foram efectuados nas mesmas condições de degradação. O mosto, devido à sua acidez, tem uma elevada capacidade de degradação do folpete (Cabras *et al.*, 1997).

A presença de folpete no mosto inibiu completamente a fermentação alcoólica das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Kloeckera apiculata*, no entanto, a ftalimida não apresenta qualquer efeito negativo na acção fermentativa das duas leveduras (Cabras *et al.*, 1997). Numa solução contendo *S. cerevisiae*, o folpete foi adsorvido pelas células de levedura devido ao seu carácter lipofílico. Quando a concentração de folpete adicionada foi elevada, apenas foi detectado folpete, quando a concentração foi baixa, apenas foi detectada ftalimida, após duas horas de incubação e quando a suspensão celular foi aquecida a 70°C não foi detectado nenhum dos produtos, concluindo os autores que a morte celular provocou alterações no processo de degradação do folpete (Viviane-Nauer *et al.*, 1997b).

Estudos efectuados em uvas tratadas três vezes com folpete marcado referem que os resíduos encontrados nas uvas foram o folpete (cerca de 27%), o ácido ftalâmico (cerca de 5,8%) e a ftalimida (cerca de 11%) e um composto não identificado (cerca de 41%) muito polar e solúvel na fracção aquosa e que, por hidrólise, produz ácido ftalâmico parecendo tratar-se de um ou mais dos conjugados do ácido ftalâmico (FAO/WHO, 1991).

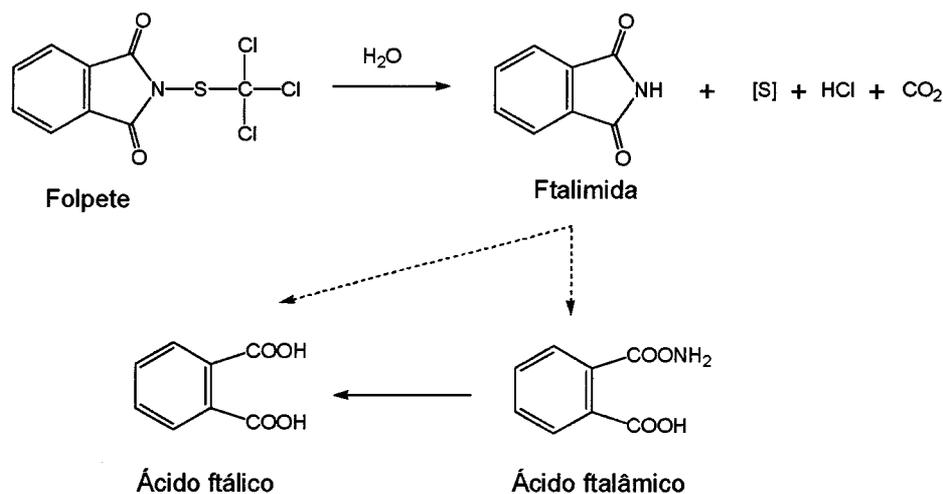


Figura 1.7 – Principais percursos de degradação do folpete nas plantas (adaptado de Cabras *et al.*, 1997; FAO/WHO, 1998).

Outros estudos mostraram que, apesar de ser bastante insolúvel em água e permanecer bastante tempo em contacto com a superfície da uvas, o folpete não apresenta tendência para penetrar na ceras epicuticulares e os resíduos detectados nas águas de lavagem foram o folpete e pequenas quantidades de ftalimida (Cabras & Angioni, 2000).

O DL 215/2001 de 2 de Agosto estabelece que os limites máximos de resíduos de folpete admitidos na cultura da vinha em Portugal são: 3 mg/kg para as uvas de mesa e 10 mg/kg para as uvas para vinho (DGPC, 2001).

1.6. INTERACÇÃO DOS FUNGICIDAS COM OS ANIMAIS

Os fungicidas, tal como a maioria dos xenobióticos aplicados nos ecossistemas, podem ser mais ou menos tóxicos para os organismos animais consoante as suas capacidades de absorção, distribuição, biotransformação e/ou excreção.

1.6.1. Metabolismo dos fungicidas nos animais

Os organismos animais possuem um conjunto de processos bioquímicos que permitem a conversão de compostos lipofílicos em compostos mais polares e, portanto mais facilmente excretáveis, sendo esses processos conhecidos como biotransformação.

As principais reacções de biotransformação dos xenobióticos, nos mamíferos são normalmente divididas em dois grandes grupos: reacções de fase I e reacções de fase II. As **reacções de fase I** convertem, geralmente, os xenobióticos em derivados mais hidrossolúveis através de reacções de oxidação, de redução e de hidrólise. Na fase I actuam, principalmente, dois sistemas oxidativos: o sistema citocromo P-450 (também conhecido por sistema monoxigenase de função mista) e o sistema amina-oxidase de função mista (ou sistema flavina-monoxigenase) que catalisam um grande número de reacções importantes para a biotransformação dos fungicidas (Sipes & Gandolfi, 1991; Omura, 1993). As **reacções de fase II** são reacções biossintéticas onde o xenobiótico e/ou o seu metabolito derivado da fase I é ligado covalentemente a uma molécula endógena (ex. ácido glucurónico, ião sulfato proveniente de um substracto endógeno, aminoácidos ou glutatióno) formando um conjugado (Sipes & Gandolfi, 1991).

Os organismos aquáticos também podem estar expostos aos resíduos de fungicidas, embora geralmente por contaminação indirecta (drenagem a partir de campos agrícolas, escoamento de efluentes industriais, etc). Estes organismos, apresentam também uma grande variedade de reacções de biotransformação, onde intervêm os

sistemas oxidativos da fase I e a conjugação com compostos endógenos (Pritchard & Bourquin, 1985).

1.6.1.1. Metalaxil

O metalaxil pode ser biotransformado pelos seres vivos com formação de um grande número de metabolitos. Segundo Kaneko *et al.* (1995), os três percursos principais propostos para a degradação do metalaxil nos animais foram os seguintes:

- (1) hidrólise do grupo metil-éter seguido da oxidação do álcool resultante, hidrólise do grupo metil-éster ou N-desalquilação da cadeia éster,
- (2) oxidação do grupo metilo do anel benzénico com formação do álcool benzílico ou a hidrólise do éster,
- (3) hidrólise do éster de metilo, seguida de N-desalquilação e conjugação com o ácido glucurónico.

A **figura 1.8** esquematiza o percurso metabólico do metalaxil em ratos proposto pela EPA (1994) e pela FAO/WHO (1996). Estudos farmacocinéticos efectuados em ratos machos e fêmeas Sprague-Dawley, após a administração de uma dose única por via intravenosa (1 mg/Kg), de uma dose única baixa por via oral (1 mg/Kg) e uma dose única elevada por via oral (200 mg/Kg) ou doses orais repetidas (1mg/Kg/dia durante 14 dias), mostraram que a via urinária foi a principal via de eliminação para os ratos fêmeas, e a via fecal para os ratos machos (EPA, 1994).

Após a administração de metalaxil marcado (27,8 mg/Kg) por via oral, em ratos fêmeas, verificou-se que ao fim de 48 horas cerca de 58% da reactividade foi excretada pela urina e 32% pelas fezes. Os principais metabolitos excretados por ambos os sistemas foram as formas livres e os conjugados glucurónicos (FAO/WHO, 1996).

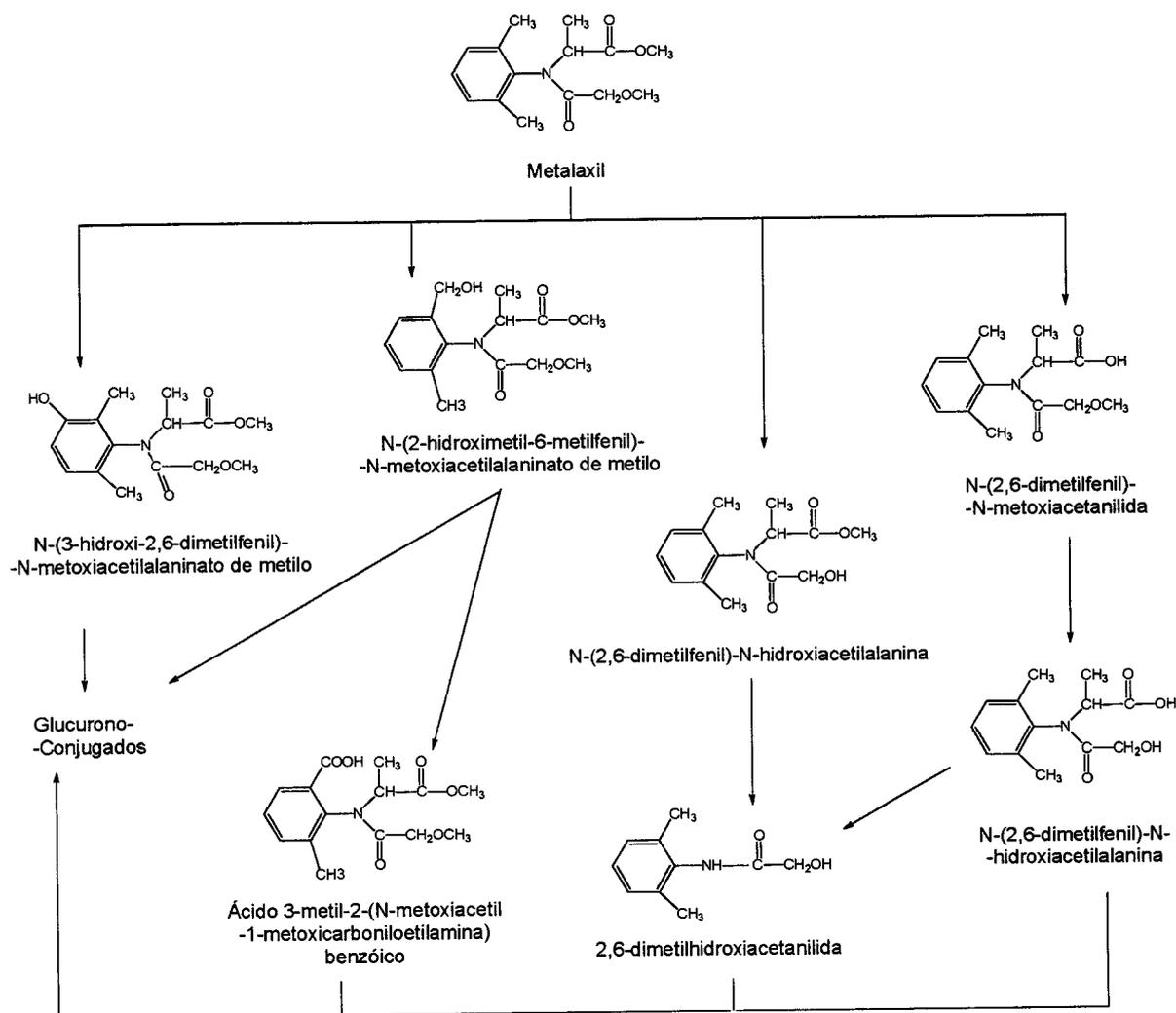


Figura 1.8 - Percurso metabólico proposto pela EPA para a degradação do metalaxil nos ratos (adaptado de EPA, 1994; FAO/WHO, 1996).

1.6.1.2. Folpete

Estudos em ratos Sprague Dawley mostraram que o folpete foi rápida e extensivamente absorvido e rapidamente excretado pela urina, não tendo sido detectado qualquer efeito cumulativo até 5 dias após a administração de uma dose única. O principal metabolito detectado na urina foi a ftalimida e o principal metabolito fecal foi o ácido ftalâmico (EPA, 1999a).

O metabolismo do folpete nos animais segue um percurso semelhante ao das plantas. O folpete dissocia-se facilmente em ftalimida, a qual se transforma em ácido ftalâmico, que, posteriormente, pode ou não ser degradado em ácido ftálico (**Figura 1.7**).

O folpete, como a maioria dos N-triclorometiltioderivados são altamente reactivos com os tecidos biológicos. Nos seres vivos, na presença de compostos tiólicos, durante a hidrólise do folpete em ftalimida também ocorre produção de tiosfogenio como se representa na **figura 1.9** (Sisler, 1982; Kaneko *et al.*, 1995).

O tiosfogenio é muito reactivo com os tecidos biológicos, transforma-se rapidamente em condições de pH neutro ou alcalino e pode sofrer conjugação com compostos endógenos, como o glutatono e a cisteína, para formar um composto de vida curta mas muito reactivo conhecido como tiazolinida (TTCA) que é bastante irritante para as mucosas e pele (Kaneko *et al.*, 1995; EPA, 1999a).

Um estudo efectuado com murganhos e ratos submetidos a uma dieta durante 21 dias consecutivos com folpete, e aos quais foi, em seguida, administrada uma única dose de folpete marcado mostrou que o ácido sulfónico foi o metabolito predominante nos ratos enquanto a tiazolidina foi o principal metabolito detectado nos murganhos, indicando uma utilização superior da cisteína e/ ou dos mecanismos do glutatono-reductase (GSH) nos murganhos (FAO/WHO, 1998).

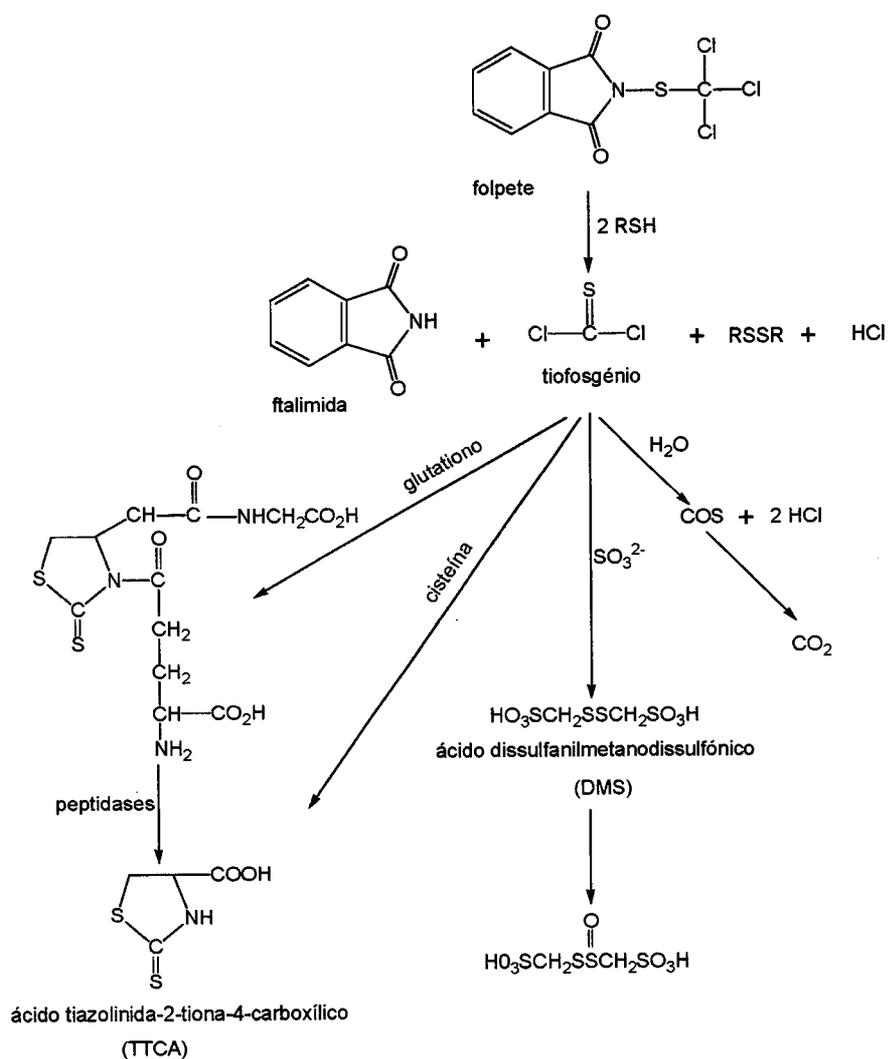


Figura 1.9 - Percurso metabólico de degradação dos triclorometiltioderivados nos sistemas biológicos (adaptado de Kaneko *et al.*, 1995).

1.6.2. Toxicidade

Os fungicidas utilizados na agricultura poderão ser tóxicos para os mamíferos que lhes possam estar expostos quer por ingestão, inalação ou por absorção dérmica. Esta toxicidade poderá ter consequências imediatas ou mais tardias, consoante a via de exposição, a dose de fungicida, o tipo de metabolismo a que esses compostos estão sujeitos e a capacidade que o organismo tem para os eliminar (Millburn, 1995).

Nas doses normalmente aplicadas para fins agrícolas, os problemas de toxicidade para os mamíferos são mais relevantes em termos de toxicidade a longo prazo, mas, na maioria dos casos, esses problemas são muito difíceis de avaliar, principalmente para o Homem, que pode estar exposto a vários produtos ao longo da sua vida sem que os efeitos se manifestem (Kaneko *et al.*, 1995).

No meio terrestre, os fungicidas podem ser tóxicos para outros animais além dos mamíferos, nomeadamente, para algumas aves e insectos. Na maioria dos casos, as doses utilizadas para fins agrícolas não afectam directamente as aves mas podem ser tóxicos para alguns insectos, nomeadamente para as abelhas produtoras de mel e para as borboletas, principalmente se estão na forma de larva e, por esta razão, colocar em risco o fenómeno da polinização (Hassall, 1990; James, 1998). A toxicidade de um fungicida para os organismos aquáticos também é muito dependente das características desse organismo (Rand & Petrocelli, 1985).

Na tentativa de avaliar os possíveis problemas de toxicidade dos fungicidas fazem-se ensaios de toxicidade aguda, subaguda e toxicidade a longo prazo com animais de laboratório (Timbrell, 1991). A toxicidade aguda e subaguda resultam da exposição a uma dose relativamente elevada de um tóxico, devido a uma administração única ou fraccionada num intervalo de tempo relativamente reduzido. A relação causa-efeito é, normalmente, fácil de estabelecer. Os efeitos são rápidos e mais ou menos graves ao

nível de diferentes órgãos e funções, sendo a morte o efeito mais grave. As intoxicações deste tipo, com fungicidas, são geralmente acidentais ou de origem criminosa. A toxicidade a longo prazo manifesta-se após exposição repetida a pequenas doses não-letais durante um longo intervalo de tempo. As intoxicações deste tipo são mais difíceis de avaliar, pois os efeitos manifestam-se quase sempre inesperadamente sem sinais de alarme e numa fase irreversível.

A exposição crónica a pequenas quantidades de pesticidas orgânicos pode levar ao aparecimento de efeitos tóxicos irreversíveis nos organismos, incluindo perturbações cerebrais, doenças sanguíneas (leucemia, anemia, etc.), intoxicação no fígado ou nos rins e, ainda, possibilidade de efeitos imunodepressivos, mutagénicos, teratogénicos e carcinogénicos (Campbell & Langford, 1991; Kaneko *et al.*, 1995).

Na tentativa de avaliar a exposição crónica aos fungicidas fazem-se, frequentemente, testes de mutagenicidade para identificar os potenciais agentes carcinogénicos, embora estes testes apenas determinem o potencial genotóxico, isto é, a acção dos compostos como agentes iniciadores do processo. A maioria dos pesticidas, não são genotóxicos mas, na presença de um agente promotor, alguns destes xenobióticos podem ser potenciais carcinogéneos, em particular os que induzem a actividade do sistema P-450 (Milburn, 1995).

Muitas experiências referem a formação de tumores em animais de experiência por exposição a vários pesticidas utilizados na agricultura, incluindo alguns fungicidas. Baseado nestas experiências, a "Environmental Protection Agency" (EPA) classificou os pesticidas em diferentes classes consoante a probabilidade de serem potenciais agentes carcinogénicos. Nenhum dos pesticidas homologados pertence à categoria de carcinogéneos humanos (**Tabela 1.4**), no entanto a maioria pertence às categorias de

provável ou possível carcinogénico humano (B e C) que são apenas baseadas em testes com animais (Reigart & Roberts, 1999).

Tabela 1.4– Classificação do potencial carcinogénico dos pesticidas pela EPA (adaptado de Fuhremann, 1991; Reigart & Roberts, 1999).

Categoria	Descrição
A	carcinogénico humano
B	provável carcinogénico humano
C	possível carcinogénico humano
D	não classificável
E	não carcinogénico

1.6.2.1. Metalaxil

Em relação à toxicidade aguda o metalaxil é classificado pela EPA como um composto pouco tóxico para mamíferos, aves e peixes (categoria toxicológica III) quando aplicado dentro das concentrações permitidas (Exttoxnet, 1996). Apesar de apresentar toxicidade aguda moderada em estudos efectuados em ratos por via oral (DL_{50} 669 mg/kg) e dérmica (DL_{50} superior a 3100 mg/Kg), estudos de toxicidade crónica efectuados em ratos e cães revelaram que o metalaxil pode provocar sérias alterações celulares a nível hepático nestes animais (EPA, 1994; Exttoxnet, 1996).

Num estudo de toxicidade subcrónica em ratos expostos a doses de 2,5 mg/Kg/dia, observou-se a redução do apetite e aumento das células do fígado (Exttoxnet, 1996). Um estudo de toxicidade crónica efectuado em cães mostrou que a administração deste fungicida conduz a um aumento nos níveis de fosfatase alcalina no sangue e a um aumento nas razões de massa entre fígado e cérebro dos animais (EPA, 1994).

Apesar da EPA (1994) ter classificado o metalaxil como pertencendo ao grupo E ou seja um pesticida que não evidencia efeitos carcinogénicos (**Tabela 1.4**), alguns estudos revelaram que o metalaxil pode provocar efeitos genotóxicos e mutagénicos (Perocco *et al.* 1995; Hrelia *et al.*, 1996; Paolini *et al.*, 1996). Um estudo *in vitro* efectuado por Perocco *et al.* (1995) sugere que o metalaxil pode ter actividade promotora da carcinogénese. Neste estudo, analisaram-se os efeitos citotóxicos do metalaxil e as propriedades transformantes num teste *in vitro* com células BALB/c 3T3 tendo sido observada a indução da transformação das células em estudo na presença de bioactivação pelo sobrenadante pós-mitocondrial.

Outros estudos mostraram que, apesar de não ter evidenciado efeitos mutagénicos nos testes de genotoxicidade efectuados em ratinho Swiss, o metalaxil apresentou resultados positivos num teste de aberração cromossómica, *in vitro*, em leucócitos humanos, sendo o tipo dominante de aberração a quebra do cromatídeo (Hrelia *et al.* 1996). As aberrações cromossómicas podem indicar alterações na homeostase celular que são importantes na instabilidade do genoma (interferência na síntese ou na condensação do DNA), podendo as lesões detectadas não resultar da interacção electrofílica do metalaxil com o DNA (Hrelia *et al.* 1996).

Noutros estudos, também se verificou que o metalaxil pode induzir lesões no DNA directamente através da sobreposição de radicais de oxigénio ou indirectamente através do aumento da activação de compostos pré-carcinogénicos. (Paolini *et al.*, 1996).

1.6.2.2. Folpete

O folpete é classificado pela EPA como um composto moderadamente tóxico para os mamíferos (categoria toxicológica II) porque, apesar de apresentar baixos valores de toxicidade aguda nos estudos em animais de laboratório, apresenta toxicidade moderada quando absorvido por inalação e quando exposto por via ocular (EPA, 1999b). Além disso, é bastante tóxico para a maioria dos seres aquáticos, incluindo peixes e invertebrados aquáticos (EPA, 1999).

A DL₅₀ observada após administração de folpete por via oral, foi de 43,8 g/Kg para machos e de 19,5 g/kg para fêmeas (Extoxnet, 1995). Um estudo de exposição ao folpete (80% p/p) realizado em animais aquáticos durante 96 horas, mostrou que este fungicida é altamente tóxico para a grande maioria das espécie de peixes, tendo sido determinados valores de CL₅₀ entre 24 e 177 mg/Kg (EPA, 1999a). Um outro estudo efectuado com *Daphnia magna* exposta a uma formulação de 44 % (p/p) durante 96 horas apresentou um valor de CL₅₀ de 600 mg/Kg (EPA, 1999).

As principais vias de exposição para o Homem são a via oral, por ingestão de resíduos ou por inalação directa do produto e a via dérmica por contacto com a pele, podendo haver risco de intoxicação aguda por ingestão de resíduos de folpete na comida e na água, embora segundo a EPA (1999a,b), esse risco seja relativamente baixo se este for aplicado nas doses e normas recomendadas.

No entanto, o folpete, como a maioria dos N-triclorometiltioderivados, pode constituir um problema em termos de toxicidade crónica, tendo sido classificado pela EPA como provável carcinogéneo humano (grupo B da **tabela 1.4**), tendo sido detectada actividade cancerígena em animais de experiência mas não nos seres humanos (EPA, 1999a,b). O mecanismo de carcinogénese proposto para o folpete é o mesmo que para os outros N-triclorometiltioderivados, que, nos tecidos biológicos, têm como metabolito

comum o tiofosgénio, o qual se julga ser o responsável pela actividade cancerígena (**Figura 1.9**) (Kaneko *et al.*, 1995; EPA, 1999a).

Estudos de reprodução em ratinhos referem um aumento de incidência de adenomas e carcinomas no duodeno, tendo sido considerado que o tiofosgénio foi o responsável pelas formações tumorais no duodeno (EPA, 1999a,b). Além disso, estudos *in vitro* referem que o folpete induz uma grande variedade de efeitos genotóxicos incluindo mutações de DNA em bactérias, células de mamíferos e leveduras (EPA, 1999a).

1.7. DISTRIBUIÇÃO E PERSISTÊNCIA DOS FUNGICIDAS NOS ECOSISTEMAS

Como já foi referido, os fungicidas introduzidos no ambiente podem ter efeitos nefastos em certos organismos, que podem, ou não, ser alvo dos mesmos. A contaminação dos solos e ecossistemas aquáticos por concentrações elevadas de fungicidas que são inadvertidamente utilizadas ou quando se dá o transporte dos fungicidas, para as águas superficiais ou para as águas subterrâneas e ainda as trocas para a atmosfera, por volatilização podem causar graves problemas nos ecossistemas (Brown *et al.*, 1995). A degradação influencia a persistência e a dinâmica de dispersão dos fungicidas aplicados nos ecossistemas (Schiavon & Morel, 1995).

Contrariamente à volatilização e à transferência que assegura uma simples separação da substância activa a partir da zona de aplicação e/ou de análise, a degradação consiste no desaparecimento do produto pela sua transformação no local de aplicação, *in situ* (Brown *et al.*, 1995). Para além dos processos bióticos atrás referidos, a

degradação dos fungicidas pode também ser devida a vários **factores abióticos** ou ainda à associação entre estes dois tipos de factores.

As principais transformações abióticas que podem ocorrer nos ecossistemas aquáticos e/ou terrestres são, essencialmente, processos de transformação fotolítica ou fotodegradação e de degradação química como as reacções de hidrólise e de oxidação - redução (Weber, 1995; Wolfe *et al.*, 1990).

A maioria das reacções de hidrólise dos fungicidas são influenciadas pelo pH e pela temperatura (Miyamoto *et al.*, 1990). Os grupos funcionais dos fungicidas mais susceptíveis de sofrer hidrólise são os ésteres de ácidos carboxílicos, as amidas, os carbamatos, os benzonitrilos e as triazinas (Wolfe *et al.*, 1990).

A fotodegradação é um dos principais processos de transformação abiótica a que os fungicidas estão sujeitos, embora a grande maioria dos compostos não apresentem espectro de absorção acima dos 290 nm e, portanto, estejam sujeitos principalmente a fenómenos de fotólise indirecta que envolvem a absorção das radiações por um composto intermediário denominado fotossensibilizador (Watkins, 1979; Wolfe *et al.*, 1990). As substâncias húmicas, os minerais de argila e os metais de transição, quando presentes no solo ou na água, podem absorver fortemente radiações do espectro de UV e actuar como fotossensibilizadores induzindo a fotodegradação dos fungicidas e outros xenobióticos (Parlar, 1990). A oxidação é o processo fotolítico predominante e os oxidantes intervenientes no processo podem ser primariamente activados por transferência de energia do fotossensibilizador excitado para o oxigénio molecular com formação de radicais de oxigénio ou pela presença de substâncias que formem radicais livres facilmente, tais como, peróxido de hidrogénio e ozono e radicais hidróxilo, peróxido e superóxido (Wolfe *et al.*, 1990). Por outro lado, alguns fungicidas são facilmente reduzidos, sob determinadas condições ambientais, através de reacções como a

desalogenação de halogenetos de alquilo e redução de quinonas a hidroquinonas, entre outras (Wolfe *et al.*, 1990).

1.7.1. Ecossistemas terrestres

O solo é talvez o maior e o mais importante reservatório temporário de acumulação de resíduos de fungicidas, porque numa maior ou menor percentagem todos estes compostos se depositam nele (Moorman, 1994). Os fungicidas podem alcançar o solo por aplicação directa ou indirectamente por arrastamento a partir das folhas das plantas onde foram aplicados, através do vento ou das chuvas, ou ainda, por deposição de fungicidas dissolvidos no vapor de água atmosférico ou na água da chuva (Arnold & Briggs, 1990; Brown *et al.*, 1995).

Os fenómenos de **retenção** do solo (adsorção-desorção) afectam o transporte, a volatilização, a degradação química e microbiológica e a biodisponibilidade dos fungicidas (Sukul & Spittler, 2000, 2001b).

A **mobilidade** é influenciada, essencialmente, por quatro factores: propriedades físico-químicas do fungicida, composição e características do solo, clima e método de aplicação (Russell, 1995). As principais características físico-químicas dos fungicidas que determinam a capacidade com que estes compostos podem ser adsorvidos pelas partículas coloidais ou de se deslocarem através do solo por lixiviação, incluem a natureza e a posição dos grupos funcionais e substituintes, a presença ou não de ligações insaturadas, a distribuição de carga à superfície do composto, o tamanho das moléculas, a polaridade, as suas características ácido-base, as suas solubilidades em água, as suas pressões de vapor e os seus coeficientes de partição, K_p (Koskinen & Harper, 1990; Russell, 1995).

O coeficiente de partição (K_p) pode ser definido como a razão entre a concentração do fungicida adsorvido por unidade de peso de fase sólida e a concentração de fungicida na fase líquida. Fungicidas com baixa pressão de vapor e pouca solubilidade em água podem ficar adsorvidos à superfície das partículas coloidais enquanto que fungicidas com grande solubilidade em água tendem a ficar em solução. O coeficiente de partição octanol-água, K_{ow} , dá um valor aproximado de K_p e é utilizado frequentemente para prever a possibilidade de bioacumulação nos seres vivos, prevendo a capacidade que o composto tem de penetrar nas membranas biológicas (Russell, 1995; Weber, 1995). K_{ow} é definido como a razão entre a concentração de fungicida na fase de octanol e a sua concentração na fase aquosa, ambas expressas em massa/volume, pelo que os valores de K_{ow} são adimensionais (Brigs, 1981; Smith, 1990).

A retenção pelas partículas coloidais do solo é proporcional aos coeficientes de distribuição dos fungicidas, K_d , nos diferentes solos, tendo também sido encontradas correlações significativas com os seus valores de K_{ow} (Russell, 1995). Actualmente, muitos investigadores relacionam a mobilidade dos fungicidas no solo com a capacidade das suas moléculas se ligarem aos constituintes orgânicos do solo, também denominada coeficiente de retenção ou o seu coeficiente de partição solo /água, K_{oc} . Por definição, K_{oc} é o valor do quociente entre a massa de sólido não iónico adsorvido por grama de matéria orgânica e a concentração de soluto na fase aquosa e é, geralmente, calculado dividindo o valor do coeficiente de distribuição, K_d , pela fracção de carbono orgânico do solo (Russell, 1995; Weber, 1994).

A mobilidade dos fungicidas num determinado solo é inversamente proporcional ao valor de K_{oc} , que mede o carácter lipofílico dos pesticidas. Para além das propriedades físico-químicas dos compostos, o conteúdo em matéria orgânica do solo, a textura (principalmente o conteúdo em argila) e o pH são as propriedades que mais influenciam a

adsorção dos fungicidas pelos colóides do solos e, conseqüentemente, a bioactividade e a mobilidade desses compostos (Weber *et al.*, 1993; Weber, 1994).

O movimento dos fungicidas através do solo pode ocorrer por difusão do fungicida na fase aquosa a favor de um gradiente de concentração, difusão para a fase gasosa do solo, se o fungicida for volátil, e fluxo de massa resultante de forças externas provenientes de moléculas de água ou de partículas do solo associadas aos fungicidas (Koskinen & Harper, 1985; Brown *et al.*, 1995).

A **lixiviação** é o processo de extracção do fungicida para a solução aquosa por deslocamento deste através do solo, dependendo do movimento dos fungicidas no solo e dos factores que lhe estão inerentes, como a sua solubilidade em água e o tipo de retenção pelos colóides do solo (Brown *et al.*, 1995). A lixiviação está correlacionada como os coeficientes K_{ow} e K_{oc} dos fungicidas (Russell, 1995). Para determinação da capacidade de lixiviação dos fungicidas, utilizam-se modelos teóricos e realizam-se estudos práticos em laboratório, utilizando colunas de lixiviação e lisímetros, onde já é possível controlar condições ambientais, mas que só são aplicáveis em situações de fluxo vertical, e/ou recorre-se a estudos de campo que apesar de serem a situação ideal de monitorização são aqueles em que as condições experimentais são mais difíceis de caracterizar e controlar (Brown *et al.*, 1995).

A **persistência** dos fungicidas no solo, como já referimos, depende, por um lado, dos processos de retenção e mobilidade e, por outro, dos processo de degradação abiótica e biótica, que ocorrem geralmente em interacção. A persistência é influenciada por muitos factores, incluindo o tipo de solo, o seu pH, a sua composição em nutrientes e colóides minerais e orgânicos, as condições ambientais (temperatura e humidade) e da presença de microrganismos activos para a biodegradação (Arnold & Briggs, 1990, Racke, 1990a; Moorman, 1994; Weber, 1994, 1995).

Os processos de **degradação abiótica** que poderão afectar a persistência dos fungicidas são, como já referimos, a fotólise e os processos de degradação química como hidrólise e as reacções de oxidação-redução. A degradação fotolítica pode ser mais ou menos significativa para os compostos colocados à superfície do solo. A degradação química é dependente da adsorção das moléculas dos fungicidas aos constituintes minerais e orgânicos do solo e do pH do solo (Moorman, 1994; Schiavon & Morel, 1995).

A **biodegradação** é um dos principais factores que contribui para a remoção dos fungicidas do solo. A biodisponibilidade dos fungicidas, condicionada pelos processos de retenção às partículas coloidais, também pode afectar a dimensão e a taxa de biodegradação (Moorman, 1994; Novack *et al.*, 1995; Sukul & Spittler, 2000). Para além destes factores, a profundidade do solo também influencia os processos de biodegradação e de transporte dos fungicidas no solo, havendo, geralmente, uma diminuição das taxas de biodegradação (por diminuição da biomassa e da taxa de respiração dos microrganismos) com a profundidade (Moorman, 1994).

1.7.1.1. Metalaxil

O metalaxil apresenta baixos coeficientes de **retenção** e elevada **mobilidade** nos solos, com valores de K_{oc} que oscilam entre 50 e 100 consoante o tipo de solo (Russel, 1995). Assim, é facilmente lixiviado em solos arenosos e com baixo conteúdo em matéria orgânica (Di & Aylmore, 1997). Kookana *et al.* (1995) referem que, num estudo de campo efectuado num solo arenoso, o metalaxil apresentou taxas de lixiviação superiores às da maioria dos fungicidas estudados tendo atingido até cerca de 30 cm de profundidade, o que foi correlacionado com o seu baixo coeficiente de retenção ($K_{oc} < 100$) e com a sua elevada mobilidade nesses solos. A mobilidade nos solos está inversamente relacionada com os conteúdos em matéria orgânica e argila e parece ser influenciada pela humidade do solo, sendo o metalaxil preferencialmente adsorvido à superfície dos minerais de

argila e em solos com elevado conteúdo de matéria orgânica e altos valores de capacidade de troca catiónica (Sharon & Edigton, 1982; Bailey & Coffey, 1985; Sharma & Awasthi, 1997; Sukul & Spiteller, 2000).

O metalaxil é um composto estável em condições normais de temperatura e luminosidade. No entanto, os processos de **degradação abiótica**, nomeadamente a hidrólise e a fotodegradação, também podem influenciar a sua distribuição e persistência nos ecossistemas (Sharom & Edgington, 1982; Murthy *et al.*, 1998; Sukul & Spiteller, 2001b).

O metalaxil é bastante estável em soluções aquosas com valores de pH entre 3.0 e 8.5, mas degrada-se rapidamente em soluções aquosas com pH igual ou superior a 10 (Sharom & Edgington, 1982). O tempo de meia-vida calculado para o metalaxil, em soluções aquosas à temperatura de 20°C, foi de 200 dias em soluções com pH entre 5 e 7, de 115 dias a pH igual a 9 e de 12 dias a pH 10 (EPA, 1994).

O metalaxil é relativamente estável à fotólise directa, devido ao baixo $\lambda_{m\acute{a}x}$ de absorção (196 nm em soluções aquosas) e quando é exposto à radiação solar o seu tempo de meia-vida foi de 40 dias (EPA, 1994). No entanto, pode estar sujeito à fotólise indirecta na presença de fotossensibilizadores que transfiram energia UV para o oxigénio e, após uma sequência de reacções, levam à formação de radicais hidróxilo, os quais vão interagir com o metalaxil por hidroxilação e, conseqüentemente, levar à sua degradação (Murthy *et al.*, 1998; Sukul & Spiteller, 2001b). A exposição do metalaxil à luz solar diminui significativamente o seu tempo de meia-vida no solo. A presença de fotossensibilizadores no solo, como a acetona, a riboflavina, o ácido húmico e o H₂O₂, aceleram a fotodegradação do metalaxil (Sukul *et al.*, 1992; Murthy *et al.*, 1998).

Um estudo de degradação em que o metalaxil foi exposto a irradiação prolongada (65 horas), sob luz solar simulada (290 nm), na presença de ácido húmico comercial,

mostrou que cerca de 65% do metalaxil foi degradado, enquanto que no mesmo estudo mas na ausência de ácido húmico apenas 10% do metalaxil foi degradado e, na ausência de radiação, não se observou degradação nem na presença nem na ausência de ácido húmico (Sukul *et al.*, 1992). A presença de água também parece ter um papel muito importante na fotodegradação deste composto, uma vez que permite a formação dos radicais hidróxilo por acção do agente fotossensibilizador (Murthy *et al.*, 1998).

Apesar do metalaxil poder estar sujeito a fenómenos de degradação abiótica, o metalaxil no solo parece ser essencialmente submetido a processos de **biodegradação** através de populações microbianas activas (Bailey & Coffey, 1985, 1986).

As taxas de degradação do metalaxil nos solos podem ser bastante diferentes consoante o tipo de solo e a composição em matéria orgânica e minerais de argila, a humidade e a temperatura dos solos e, ainda, com a população microbiana existente (Kookana *et al.*, 1995). Num estudo de campo efectuado por Wauchope *et al.* (1992) o metalaxil apresentou valores de tempo de meia-vida compreendidos entre 7 e 170 dias, de acordo com as condições de campo. Horst *et al.* (1996) referem que, num estudo efectuado em campos de golfe submetidos a tratamentos com metalaxil, o tempo médio calculado para a dissipação do metalaxil nos solos com plantação de relva foi de 16 dias. Os elevados conteúdos em matéria orgânica e valores de capacidade de troca levam à diminuição da biodisponibilidade do metalaxil nos solos e, conseqüentemente, a um aumento do tempo de meia-vida (Sharma & Awasthi, 1997; Sukul & Spiteller, 2000, 2001a). O tempo de meia-vida do metalaxil também aumenta com a profundidade do solo, o que pode estar correlacionado com o facto da população microbiana presente nas camadas profundas ser muito inferior à da superfície, podendo, assim, este fungicida persistir muito mais do que o esperado e atingir facilmente as águas subterrâneas (Kookana *et al.*, 1995).

1.7.1.2. Folpete

O folpete é praticamente insolúvel em água e é muito pouco lixiviado no solo, pelo que, a possibilidade de contaminação das águas subterrâneas é limitada (EPA, 1999a). No entanto, já foram detectados resíduos de folpete em águas superficiais em valores superiores aos admitidos pela legislação (Picó *et al.*, 1994).

No ambiente, o folpete é estável em condições de baixa humidade mas decompõe-se facilmente pela luz e é hidrolisado em condições neutra ou alcalinas (EPA, 1999). O folpete degrada-se rapidamente no solo, com formação de ftalimida e de CO₂, apresentando tempos de meia-vida relativamente baixos nos solos (EPA, 1999a,b). O tempo de meia-vida estimado pela EPA, usando um modelo de degradação integrado de primeira ordem foi de 2,6 dias para o folpete e de 17,2 dias para a ftalimida. O seu desaparecimento nos solos parece estar simultaneamente dependente dos processos de hidrólise abiótica e de degradação microbiana (EPA, 1999a,b).

1.7.2. Ecossistemas aquáticos

1.7.2.1. Ecossistemas naturais

O ambiente aquático é complexo e diversificado e o seu equilíbrio é resultante das interacções que se estabelecem entre os diversos factores ambientais e os seres vivos (Rand & Petrocelli, 1985).

Os fungicidas nos ecossistemas aquáticos podem estar dissolvidos na água, adsorvidos em componentes bióticos (microrganismos) e abióticos (partículas coloidais orgânicas e minerais dos sedimentos) ou acumulados nos organismos vivos (Eke *et al.*, 1996). Se apresentarem elevada solubilidade em água e uma pressão de vapor baixa, então a probabilidade dos fungicidas se encontrarem dissolvidos na água é elevada,

como acontece com o metalaxil. Pelo contrário, se um fungicida apresentar baixa solubilidade em água e baixa pressão de vapor e tiver um coeficiente de partição elevado, então esse composto encontrar-se-á predominantemente adsorvido à superfície das partículas coloidais (Nimmo, 1985).

Os processos de adsorção-desorção no meio aquático, que influenciam significativamente o destino destes xenobióticos nos ecossistemas aquáticos, estão correlacionados com a natureza dos sedimentos (diâmetro das partículas, conteúdo em colóides inorgânicos e em substâncias húmicas, etc.) e com as características do fungicida, nomeadamente, a solubilidade em água, coeficiente de partição octanol-água e pressão de vapor (Roberts, 1990).

1.7.2.1.1. Metalaxil

O metalaxil, como é um composto bastante solúvel em água e relativamente móvel no solo, pode ser arrastado pelas águas da chuva e atingir os aquíferos naturais (Weber, 1985, Russell, 1995). De acordo com a legislação, a concentração de metalaxil nas águas bebíveis não pode exceder 10 µg/L (DL 236/98 de 1 de Agosto).

A persistência do metalaxil nestes ecossistemas está condicionada não só pela biotransformação pelos organismos vivos mas também de processos de degradação abiótica, envolvendo, principalmente, reacções de fotólise, de hidrólise e de oxidação. Estudos de fotodegradação efectuados com soluções aquosas de metalaxil mostraram que a irradiação directa de luz UV origina um rearranjo do grupo N-acilo da posição 4 do anel aromático, com transformação de 70 % do substrato em 5 dias e formação de dois produtos: N-2,6-dimetil-4-metoxiacetilfenilalaninato de metilo e N-2,6-dimetil-4-acetilfenilalaninato de metilo (**Figura 1.10**) (Yao *et al.* 1989).

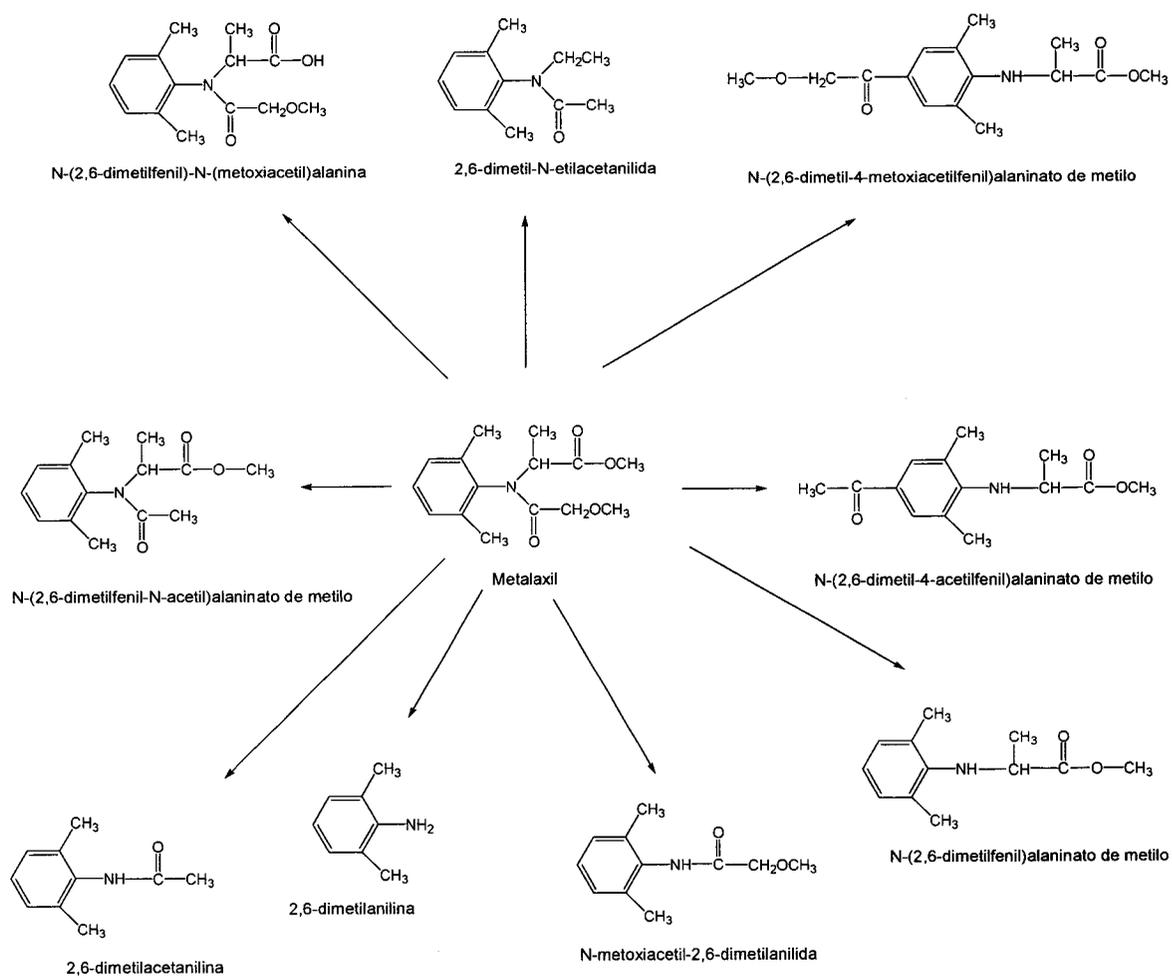


Figura 1.10 – Produtos resultantes da irradiação do metalaxil em solução aquosa (adaptado de Yao *et al.*, 1989; Sukul *et al.*, 1992).

Outros estudos (Sukul *et al.*, 1992) referem que a irradiação de uma solução aquosa de metalaxil com radiações UV de comprimentos de onda de 250 nm e de 290 nm provocam a degradação, ao fim de 3 horas, de 50% e de menos de 10%, respectivamente. Segundo Sukul *et al.* (1992), a fotodecomposição do metalaxil envolve principalmente a N desalquilação e desmetilação com o rearranjo do grupo N-acilo da posição 4 do anel aromático. Os principais metabolitos formados, no estudo efectuado por Sukul *et al.* (1992), por fotodegradação do metalaxil em soluções aquosas submetidas à exposição de diferentes níveis de radiações UV, foram a N-(metoxiacetil)-2,6-dimetilanilina, a 2,6-dimetil-N-etilacetanilida e o N-(2,6-dimetilfenil)alaninato de metilo (Figura 1.10).

O pH do meio parece influenciar a fotodecomposição dos fungicidas, sendo referido, por Yao *et al.* (1989), que as taxas mais elevadas de degradação foram obtidas a valores de pH 2,8 e que as taxas de degradação mais baixas foram observados a pH 8,8.

1.7.2.1.2. Folpete

Os estudos existentes sobre a degradação do folpete nos ecossistemas aquáticos são baseados em modelos. Estes estudos indicam que o folpete pode atingir a camada superficial da água na concentração máxima de 159 µg/L (EPA, 1999a,b).

A hidrólise parece ser o percurso predominante da degradação do folpete nos ecossistemas aquáticos (Wolfe *et al.*, 1976). Em soluções aquosas, degrada-se rapidamente em ftalimida, seguindo o esquema apresentado na figura 1.5 (página 27). O processo de degradação por hidrólise está dependente do pH (Wolfe *et al.*, 1976). O folpete, em soluções de pH igual ou superior a 7, decompõe-se totalmente em ftalimida em 24 horas, enquanto que, em soluções ácidas cerca de 57% do folpete, após em 24 horas, permanece em solução, à temperatura ambiente (Viviane-Nauer *et al.*, 1997a).

Estudos com folpete marcado mostraram que a degradação deste composto é bastante variável com o pH referindo que os tempos de meia-vida do folpete foram de 2,6 horas numa solução tampão de pH 5, de 1,1 hora numa zona tampão de pH 7 e de 67 segundos a pH 9 (EPA, 1999).

A fotodegradação não parece ser um processo significativo de degradação do folpete nos ecossistemas aquáticos (EPA, 1999a).

O folpete já foi detectado nas águas de superfície na concentração de 6,25 µg/L, valor muito superior ao valor máximo admitido para pesticidas pela União Europeia que é de 3 µg/L nas águas de superfície e de 0,1 µg/L nas águas de rede de distribuição (Picó *et al.*, 1994)

1.7.2.2. Águas subterrâneas e sedimentos

A actividade agrícola, para além da indústria e dos processos de destruição de resíduos, é vista como a maior fonte de contaminação das águas subterrâneas por fungicidas (Cohen, 1990). Para além do comportamento dos fungicidas nos ecossistemas naturais é importante também conhecer o seu comportamento em águas subterrâneas e sedimentos (Bennett, 1990; Legrand *et al.*, 1991; Eke *et al.*, 1996).

O **metalaxil**, devido ao baixo coeficiente de adsorção nos solos (K_{oc}) e à sua elevada solubilidade em água, apresenta grande mobilidade e elevada capacidade de lixiviação nos solos (Di *et al.* 1995, Di & Aylmore, 1997). Por outro lado, o metalaxil apresenta uma baixa afinidade para a matéria orgânica do solo, muito inferior à de outros fungicidas mais hidrófobos, o que aumenta a sua capacidade de lixiviação e consequente a probabilidade de atingir as águas subterrâneas (Andrades *et al.*, 2000). O metalaxil foi detectado nas águas subterrâneas em vários estados do continente americano em concentrações superiores a 3 µg/L (EPA, 1994).

Um dos parâmetros mais importantes para controlar a possibilidade de contaminação das águas subterrâneas dos pesticidas é determinar a sua persistência nos solos (Kookana, 1995). Nesse sentido, alguns investigadores criaram modelos teóricos para prever o seu comportamento nos solos e avaliar a probabilidade de contaminação das águas subterrâneas. Di *et al.* (1995) referem que, dos fungicidas estudados, o metalaxil foi o que apresentou maior mobilidade nos solos e que as baixas capacidades de degradação do solo e as elevadas taxas de precipitação facilitaram a lixiviação do metalaxil para níveis de profundidade superiores e a, conseqüente, contaminação das águas subterrâneas.

Num outro estudo, utilizando um modelo diferente, o metalaxil apresentou grandes probabilidades de atingir concentrações elevadas a níveis relativamente profundos, tendo sido estimado um tempo de 0,5 anos para percorrer 150 cm de profundidade, de 0,6 anos para percorrer 300 cm e de apenas 0,8 anos para atingir os 500 cm de profundidade, confirmando a grande probabilidade do metalaxil contaminar águas subterrâneas (Di & Aylmore, 1997).

No entanto, os modelos propostos apresentam uma grande variabilidade consoante as características dos solos e a capacidade que estes apresentam para degradar os fungicidas, as quais afectam significativamente a mobilidade e a persistência destes compostos (Di & Aylmore, 1997).

Não existem estudos sobre a probabilidade do **folpete** contaminar as águas subterrâneas. Como já referimos, apesar da elevada mobilidade dos seus resíduos, devido ao seu modo de aplicação e baixa solubilidade em água, a EPA (1999a) considera que existe uma baixa possibilidade de contaminação de águas subterrâneas, embora já tenham sido detectados resíduos de folpete em águas bebíveis (Picó *et al.*, 1984).

1.8. BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS

Nas últimas décadas, a prevenção da poluição difusa dos solos e águas subterrâneas, assim como a descontaminação de áreas contaminadas tem constituído uma das prioridades das políticas ambientais, tendo sido propostas várias estratégias de remediação envolvendo processos de tratamento físico, químico ou biológico (Bollag & Bollag, 1995).

Nos processos de biorremediação recorre-se à aplicação de microrganismos ou outros seres vivos para mineralizar ou transformar os poluentes em compostos menos tóxicos (Bollag & Bollag, 1995; Lenhard *et al.*, 1995). As características da tecnologia de biorremediação (degradação e mineralização do poluente em biomassa, CO₂ e H₂O) tornam-na numa alternativa atractiva, benéfica para o ambiente e com baixo custo efectivo relativamente aos tratamentos convencionais, os quais requerem a incineração, volatilização ou imobilização do poluente (Heitzer & Sayler, 1993). Os tratamentos convencionais simplesmente transferem a poluição, criando, assim, uma nova fonte de poluição como os resíduos da incineração e não eliminam o problema (Newcombe & Crowley, 1999).

A aceitação da biorremediação como uma tecnologia de tratamento dos poluentes benéfica para o ambiente e relativamente económica requer a demonstração da sua eficácia e confiabilidade e também das suas vantagens relativamente aos tratamentos convencionais (Heitzer & Sayler, 1993). O desenvolvimento do processo de biorremediação pode ser dividido em vários níveis interligados. Primeiro, tem que se fazer uma caracterização detalhada do processo tendo em conta a natureza química do contaminante, as propriedades hidrogeoquímicas do local contaminado e as suas características microbiológicas (**Figura 1.11**). Posteriormente, deve escolher-se o processo de tratamento adequado e optar por um tratamento *in situ* (no local

contaminado) ou por um tratamento no laboratório e, em seguida, deve proceder-se à implementação e optimização do processo de tratamento em escala. Neste processo de monitorização é necessário verificar se os objectivos de descontaminação foram alcançados, se o tratamento é economicamente competitivo, se os recursos económicos, ambientais e naturais foram considerados na avaliação global, se os aspectos ecotoxicológicos foram tidos em conta e, ainda, se foi demonstrada a natureza biológica do processo e quais as contribuições relativas dos factores abióticos (Heitzer & Sayler, 1993).

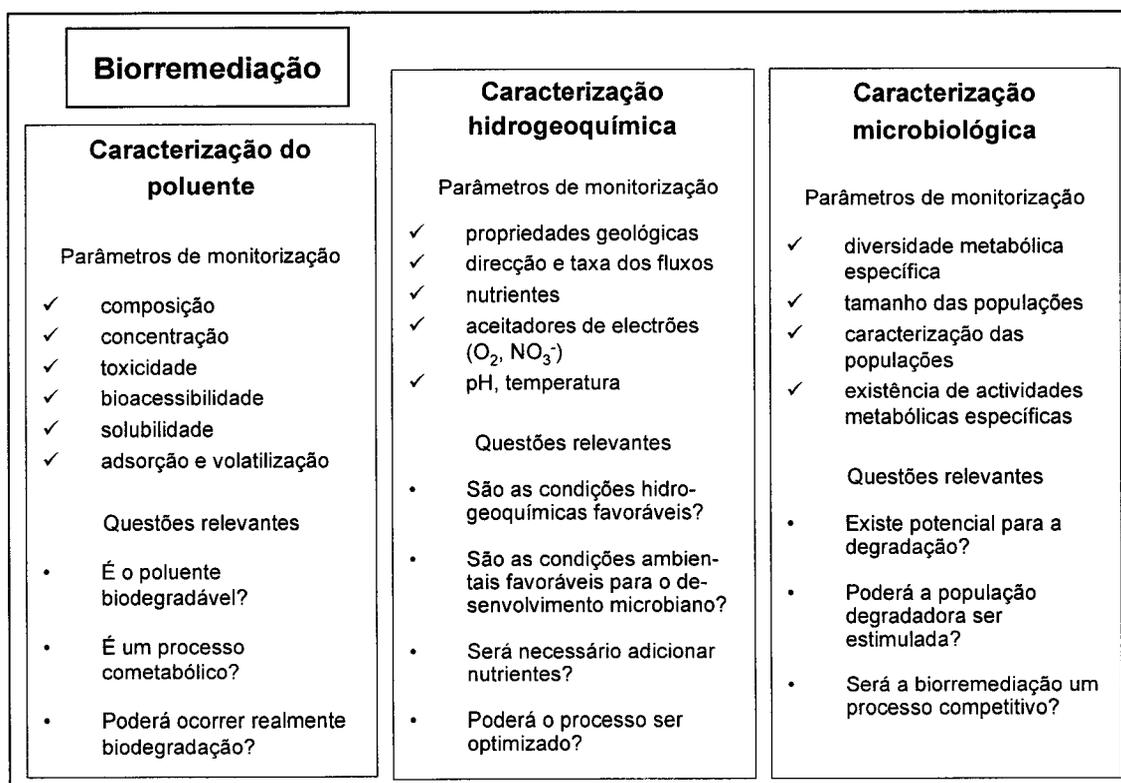


Figura 1.11 - Factores a considerar no desenvolvimento do processo de biorremediação (adaptado de Heitzer & Sayler, 1993).

Existem, no entanto, algumas dificuldades na plena implementação das técnicas de biorremediação, entre as quais podemos referir a existência de um grande número de poluentes que não são biodegradáveis, a complexidade das estratégias para a implementação de processo *in situ*, a não existência de mão-de-obra qualificada, a limitação na utilização de microrganismos geneticamente modificados e o facto da biorremediação não resultar na obtenção de produtos com alto valor acrescentado (Caplan, 1993).

Os organismos responsáveis pela biodegradação são bastante diversificados na sua natureza ecológica e taxonómica, o que justifica que o processo de biodegradação ocorra nas mais diversas condições ambientais. A biorremediação explora a diversidade genética e a versatilidade metabólica dos microrganismos para a transformação dos contaminantes em produtos finais menos tóxicos, os quais estão integrados nos ciclos biogeoquímicos (Liu & Sufliya, 1993). Entender a ecologia, fisiologia e a evolução das populações microbianas com capacidade para degradar os xenobióticos é essencial para o sucesso e implementação da biorremediação (**Figura 1.12**).

A biorremediação do solo efectuada com sucesso constitui um conjunto de três factores independentes mas interligados: o poluente, os microrganismos e o ambiente. A estrutura e função, a concentração e distribuição e a variabilidade genética ou fisiológica dos microrganismos residentes ou de populações microbianas adicionadas controlam o sucesso da biorremediação (Turco & Sdowsky, 1995).

Os xenobióticos entram nos ecossistemas terrestres numa variedade de formas químicas e de estados de oxidação-redução. O objectivo da biorremediação é transformar o ecossistema para que este se comporte como um “biorreactor” no qual os microrganismos existentes no solo consigam transformar esses poluentes e integrá-los em ciclos biogeoquímicos de forma a tornarem-se menos tóxicos (Harris & Arnold, 1995).

As transformações básicas mais frequentes para promover a biorremediação incluem os seguintes procedimentos:

- ✓ Activação *in situ* dos microrganismos por adição de um reagente, em quantidade limitada, que possua uma estrutura química semelhante ao poluente (que actue como dador ou aceitador de electrões e /ou nutriente), e que vai estimular o crescimento microbiano e acelerar a biodegradação de determinados contaminantes dissolvidos ou adsorvidos no local (Brouwer & Zehnder, 1993; Harris & Arnold, 1995)
- ✓ Inoculação *in situ* de populações formadas por organismos que possuam uma capacidade de degradação facilitada de um dado poluente (Harris & Arnold, 1995).
- ✓ Estabelecimento *in situ* dos nutrientes e do biorreactor ambiental formado por populações geneticamente modificadas e/ou organismos enriquecidos em cultura pura ou por um consórcio de organismos capazes de degradar de forma mais rápida um determinado poluente (Harris & Arnold, 1995).

A biorremediação *in situ* envolve a utilização de organismos para remover os poluentes do local contaminado. Para que ocorra biodegradação é necessário que os microrganismos possuam os enzimas necessários, que esses organismos estejam presentes no local contaminado com o composto químico, que esse composto esteja acessível ao esses microrganismos e que a quantidade de biomassa seja suficiente para a degradação (Alexander, 1994). Frequentemente, esses microrganismos necessitam previamente de se adaptar ao local e de crescer na presença do poluente num ambiente particular para que o possam degradar (Bollag & Bollag, 1995). A inoculação de microrganismos no solo pode levar a um aumento da biodegradação, designado por biodegradação facilitada (Alexander, 1994).

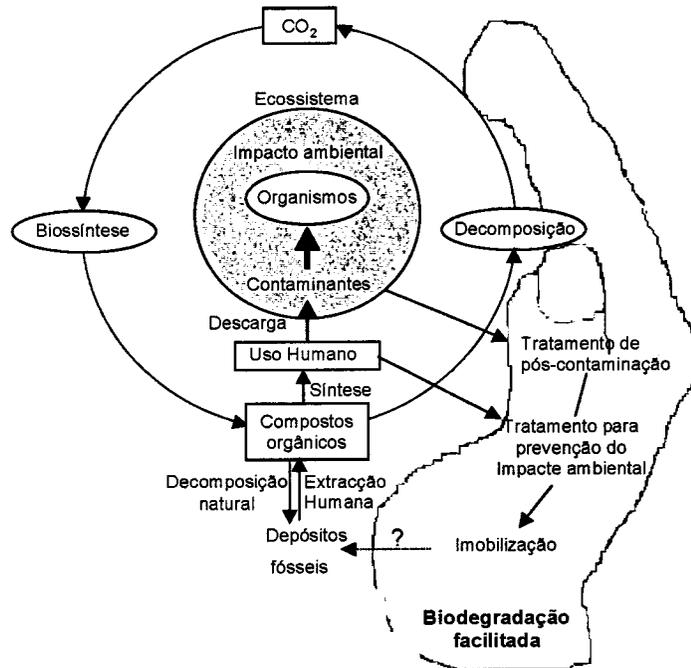


Figura 1.12 – Biorremediação: dando uma “mão” para beneficiar a natureza (adaptado de Liu & Sulfitá, 1993).

Os microrganismos aplicados nos processos de biorremediação podem ser residentes (isolados previamente desse local) ou exógenos relativamente ao local contaminado (Turko & Sadowsky, 1995). Embora muitos microrganismos utilizados no processo de biodegradação pertençam às comunidades microbianas naturais, as técnicas de biorremediação mais recentes recorrem a técnicas de engenharia genética ou a técnicas de selecção para a construção ou isolamento de microrganismos que possuam uma maior capacidade para a biodegradação.

Todavia, estabelecer um número significativo de microrganismos com capacidade de biodegradação *in situ* nem sempre é fácil porque pode ocorrer uma competição com a população residente. Nestes casos, obtém-se melhores resultados quando as estirpes de microrganismos seleccionadas fazem parte da comunidade microbiana do local, verificando-se que estas têm maior capacidade para se adaptar e desenvolver no ambiente local (Turko & Sadowsky, 1995).

Vários factores podem influenciar a competitividade da população residente e dos microrganismos aplicados nos solos. Estes podem ser divididos em factores abióticos e factores bióticos os quais incluem nutrientes limitantes e especificidade, necessidade de humidade, pH, relações com a temperatura, textura do solo e porosidade, conteúdo em matéria orgânica, produção de antibióticos, tipos e concentrações de soluto, número e tipos de populações microbianas residentes, predação selectiva, tempo de residência nos solos e mobilidade no solo (Turko & Sadowsky, 1995).

Todos estes factores, isolados ou em conjunto, desempenham papéis importantes na introdução de organismos nos ecossistemas naturais com o objectivo da biorremediação. Para além disso, há ainda a considerar a tecnologia de biorremediação utilizada: enquanto que aplicações repetidas de altas concentrações de um microrganismo particular podem ser possíveis nas aplicações em biorreactor, estas são mais difíceis de concretizar e dispendiosas nos processos de biodegradação *in situ*, pois para além de requerer o controlo dos parâmetros abióticos para otimizar o crescimento microbiano também é necessário ter em conta a população residente (Turko & Sadowsky, 1995; Newcombe & Crowley, 1999).

Os microrganismos podem degradar muitos contaminantes orgânicos alifáticos e aromáticos, quer para obter carbono e/ou energia para crescimento quer para os utilizarem como co-substratos convertendo-os deste modo em produtos como CO₂, H₂O

e biomassa. Estas biotransformações podem ser exploradas para o tratamento de contaminantes do solo e de águas subterrâneas (Bouwer & Zehnder, 1993).

Nos últimos anos foram isolados microrganismos com capacidade para degradar compostos orgânicos que anteriormente eram considerados não biodegradáveis, sugerindo que sob condições específicas de poluição ambiental é possível desenvolver microrganismos com capacidade para degradar esses xenobióticos (Timmis & Pieper, 1999).

Nas áreas agrícolas e águas subterrâneas ou de superfície adjacentes, a grande maioria dos poluentes são pesticidas ou seus derivados (Alexander, 1994). Num processo de contaminação dos compartimentos ambientais (água, ar, sedimento e solo) com um determinado pesticida é necessário ter em conta os processos bióticos e abióticos que ocorrem nos vários compartimentos, como já se referiu anteriormente. A importância relativa dos processos individuais num dado compartimento depende das propriedades físico-químicas do fungicida e das características da matriz local como também das condições ambientais (Heitzer & Sayler, 1993). Os microrganismos do solo podem determinar o destino desses compostos químicos no solo. Os processos de biorremediação podem ser particularmente importantes na remoção de pesticidas em solos sem actividade microbiana onde estes compostos orgânicos se podem acumular em maior extensão e contaminar não só os ecossistemas terrestres mas também os aquáticos (Chen & Mulchandani, 1998).

As comunidades microbianas desempenham um papel significativo nas transformações dos pesticidas: bactérias e fungos são os principais intervenientes no processo de degradação dos pesticidas no solo e dos seus metabolitos (Chen & Mulchandani, 1998). Alguns trabalhos referem a utilização de microrganismos para degradar pesticidas em biorreactor e *in situ* (Alexander, 1994; Aislabie & Lloyd-Jones,

1995; Newcombe & Crowley, 1999). A biodegradação facilitada *in situ* tem sido utilizada para a remediação de locais contaminados com halogenetos alifáticos, pesticidas clorados, compostos nitroaromáticos e aromáticos policíclicos (Bollag & Bollag, 1995; Martin *et al.*, 1995, 1999; Miller, 1995; Chaîneau *et al.*, 1999; Scharp *et al.*, 2000).

Os fungos apresentam uma maior capacidade de degradar *in situ* os poluentes orgânicos no solo do que as bactérias devido ao seu tipo de crescimento filamentoso que lhes confere uma maior propagação no solo e aumento da sua biomassa, permitindo aplicá-los com sucesso nos processos de biorremediação do solo (Glaser & Lamar, 1995).

Certos fungos são conhecidos pela sua diversidade e capacidade para degradar materiais naturais complexos e persistentes. Os fungos da podridão branca, vulgarmente denominados “White rot fungi” pertencentes ao grupo dos Basidiomicetes têm capacidade para degradar a linhina e possuem um sistema de peroxidases extracelulares que, conjuntamente com o peróxido de hidrogénio produzido pelo fungo, catalisam a degradação de um grande número de compostos orgânicos, incluindo hidrocarbonetos poliaromáticos, pentaclorofenol e muitas classes de pesticidas (Alexander, 1994; Glaser & Lamar, 1995). No entanto, nem sempre há correlação entre a capacidade que alguns desses fungos possuem para degradar a linhina e a capacidade que apresentam para degradar alguns pesticidas (Bending *et al.*, 2002).

Para além deste grupo de fungos, têm sido referidos na bibliografia, fungos pertencentes a outras classes que apresentam capacidade para degradar poluentes orgânicos, em particular, pesticidas, incluindo alguns fungos pertencentes aos Zigomicetes, como *Cuningamella elegans* e *Sycephalotrum racemosum* (Zheng *et al.*, 1989).

Assim, os métodos de biodegradação de pesticidas no solo, incluindo fungicidas, poderão constituir uma alternativa importante relativamente aos métodos físico-químicos e à incineração, altamente poluente. A aplicação de microrganismos que apresentem capacidade para se adaptar aos solos e que, simultaneamente, consigam tolerar e degradar concentrações relativamente elevadas destes pesticidas pode constituir um processo importante de remoção destes xenobióticos do solo.

CAPÍTULO 2

Biodegradação dos fungicidas metalaxil e folpete por populações microbianas de solos mediterrânicos do Alentejo.

2.1. INTRODUÇÃO

Os solos desempenham um papel fundamental na caracterização e na manutenção dos ecossistemas, servindo de habitat para um elevado número de organismos. A presença e acumulação de compostos orgânicos, incluindo pesticidas, poderá contribuir para uma diminuição da qualidade e equilíbrio dos solos e contaminação das reservas de água, sendo importante removê-los o mais rapidamente possível (Roper & Ophel-Keller, 1998; Brady & Weil, 1999).

A biodegradação é considerada o principal modo de eliminação dos pesticidas no solo devido à existência de alguns microrganismos residentes que possuem capacidade para se adaptar e degradar estes compostos (Somerville, 1987; Racke, 1990a). A quantidade de organismos do solo é influenciado pela matéria assimilável disponível, pelas características físico-químicas do solo (estrutura e textura do solo, acidez, conteúdos em minerais, matéria orgânica e nutrientes dissolvidos) e, ainda, por factores bióticos (predação e competição) e ambientais (humidade e temperatura) (Killhan, 1996; Brady & Weil, 1999).

A frequência das estirpes e espécies presentes numa população microbiana de um solo está dependente do equilíbrio dinâmico entre essa população e o seu ambiente físico, químico e biológico, sendo variável com o momento em que é efectuada a colheita (Wollum, 1982; Germida, 1993). Assim, a actividade microbiana e a densidade populacional estão dependentes das reservas existentes no solo e são geralmente superiores nas camadas superficiais do solo devido à maior disponibilidade de matéria orgânica e oxigénio (Somerville, 1987; Mitchell, 1993; Brady & Weil, 1999).

A aplicação de pesticidas no solo pode provocar alterações no equilíbrio ecológico da população microbiana, com predominância de uma parte da população que apresentou resistência a estes compostos ou então a uma diminuição transitória ou definitiva da actividade biológica de acordo com a toxicidade e persistência do composto (Tortensson, 1987; Rath *et al.*, 1998).

Por outro lado, a persistência e a degradação destes xenobióticos dependem da natureza química dos compostos, das características do solo e da actividade microbiana. A concentração de fungicida livre no solo depende do tipo e da quantidade de biomassa existente, das condições atmosféricas e das propriedades físico-químicas do solo. A composição do solo influencia não só a proliferação dos microrganismos e as suas

actividades de biodegradação mas também os processos de retenção dos compostos aos constituintes orgânicos e inorgânicos do solo (Novack *et al.*, 1995; Roper & Ophel-Keller, 1998).

Como foi referido no capítulo anterior, entre as propriedades físico-químicas do solo que influenciam a percolação e a degradação dos fungicidas podem referir-se a textura, a humidade do solo, o pH, o conteúdo em matéria orgânica e a capacidade de troca iónica (Warren & Weber, 1994; Brady & Weil, 1999). As partículas minerais formam facilmente agregados com os microrganismos e, conjuntamente com o conteúdo em humidade do solo influenciam a proliferação e actividade dos microrganismos nos solos (Wood, 1995; Paul & Clark, 1989; Tan, 1994). A fracção orgânica influencia os processos de adsorção dos pesticidas e a capacidade de troca catiónica, condicionando a biodisponibilidade destes xenobióticos e a capacidade de retenção de água pelo solo (Tortensson, 1987; Sukul & Spittler, 2000).

A importância da biodiversidade na degradação de compostos com propriedades fungicidas deverá ser avaliada para cada um em particular, tendo sido isolados dos ambientes aquáticos e terrestres diversos géneros de bactérias e fungos, com base nas suas propriedades para degradar fungicidas (Cheng, 1990; Racke & Coats, 1990).

O trabalho descrito neste capítulo teve como objectivos avaliar a capacidade de biodegradação dos fungicidas metalaxil e folpete por populações microbianas em amostras de solo com diferentes níveis de exposição prévia aos fungicidas em estudo e seleccionar o solo a partir do qual os estudos iriam prosseguir, tendo em vista o isolamento de estirpes com actividade para degradar estes compostos.

Como o tipo e a composição físico-química do solo podem influenciar qualitativa e quantitativamente a flora microbiana presente bem como os processos de degradação dos fungicidas, nestes estudos foram seleccionados três solos agrícolas do mesmo tipo,

de acordo com a carta de solos de Portugal, mas que diferiam no número de tratamentos a que as suas culturas já tinham sido submetidas a um fungicida comercial que contém na sua formulação metalaxil e folpete. Procedeu-se à caracterização físico-química e microbiológica dos solos em análise e à determinação das taxas de degradação destes fungicidas nas amostras de solo para tentar avaliar se a biodegradação seria ou não “facilitada” nos solos cujas culturas tinham sido submetidas a tratamentos prévios com estes fungicidas e se teria havido ou não selecção da população microbiana desses solos após várias exposições aos fungicidas metalaxil e folpete.

2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1. Fungicidas utilizados

O fungicida comercial utilizado para o controlo do míldio da videira nos tratamentos das vinhas em estudo foi uma formulação comercial que contém 10g de metalaxil e 40 g de folpete por 100g de produto.

Esta formulação comercial anti-míldio foi também utilizada para os estudos de degradação nos solos descritos neste capítulo.

Para a quantificação dos fungicidas utilizaram-se os padrões de metalaxil e folpete para HPLC (Riedel-de Haën) com um grau de pureza, respectivamente, de 99,7% e de 99,5%.

2.2.2. Solos em estudo

Estudaram-se amostras de solos de duas vinhas com diferentes níveis de exposição a este fungicida comercial e amostras de um solo que nunca foi exposto a tratamentos com o fungicida.

Os solos em estudo (**Figura 2.1**) estão situados a sudeste de Évora e foram designados pelas letras A, B e C, correspondendo o **solo A** ao solo com cultura de vinha desde 1977, o **solo B** ao solo com cultura de vinha desde 1983 e o **solo C** ao solo sem vinha, destinado à cultura de diversos cereais. Os solos A e B são solos de vinhas que foram submetidas, respectivamente, a 16 e a 10 tratamentos com o fungicida comercial. A periodicidade dos tratamentos foi anual e o último tratamento de cada uma dessas vinhas foi efectuado 11 meses antes da data de colheita das amostras de solo utilizadas no estudo.

De acordo com a carta de solos de Portugal 40 B (**Figura 2.1**), os solos em estudo são solos Argiluvitados pouco insaturados do tipo mediterrânico, vermelhos ou amarelos de materiais não calcários de “rañas” ou depósitos afins: **Sr** (Cardoso, 1965).

Nestes solos, o horizonte A (até 15-25 cm) apresenta-se castanho-avermelhado ou pardo-avermelhado, franco-arenoso a franco-argiloso, normalmente com alguns ou bastantes elementos grosseiros (quartzo e quartzitos), estrutura granulosa fina, friável, por vezes com congregações ferruginosas, com transição gradual para o horizonte B (20 - 50cm) de cor vermelho-escuro ou castanho avermelhado ou pardo amarelado, franco a argiloso, com maior percentagem de argila que o horizonte A, normalmente com bastantes elementos grosseiros, estrutura anisóforme subangulosa fina, por vezes com pequenas congregações ferruginosas e o horizonte C é constituído por material dendrítico, em geral pouco consolidado, do tipo “raña” (Cardoso, 1965).

2.2.3. Recolha e conservação das amostras

As recolhas de amostras foram efectuadas na camada superficial do solo até 20 cm de profundidade, de acordo com os procedimentos normalmente recomendados para colheitas de amostras de solos (Crepin & Johnson, 1993). Para cada solo em estudo foi preparada uma amostra composta com material recolhido em pelo menos quinze pontos diferentes do terreno escolhidos aleatoriamente, de forma a obter-se uma amostra composta, representativa do local em análise.

As amostras para o estudo físico-químico, após secagem à temperatura ambiente, foram passadas através de um crivo com malha de 2 mm de diâmetro e homogeneizadas. Uma parte da terra fina (solo com granulometria inferior a 2 mm) foi ainda submetida a outra passagem através de um crivo de 0,2 mm de malha para análise da matéria orgânica e do azoto total. As amostras de solo com granulometria inferiores a 2 mm e a 0,2 mm foram devidamente etiquetadas e armazenadas à temperatura de 4°C.

As amostras utilizadas no estudo microbiológico, após colheita, foram imediatamente passadas através de crivos esterilizados, com malha de 2 mm de diâmetro, homogeneizadas e armazenadas em sacos esterilizados à temperatura de 2 a 4°C. A caracterização microbiológica foi efectuada até um máximo de 18 horas de armazenamento, para evitar alterações da amostra devidas ao prolongamento do período de armazenamento, como refere Carter (1993).

2.2.4. Estudo físico-químico

O estudo físico-químico de cada um dos solos incidiu sobre os seguintes parâmetros: determinação da textura e tipo de solo por análise granulométrica, determinação do pH, da condutividade eléctrica e da percentagem de matéria orgânica, doseamento do azoto na forma de nitratos e do azoto total, doseamento do fósforo (P_2O_5)

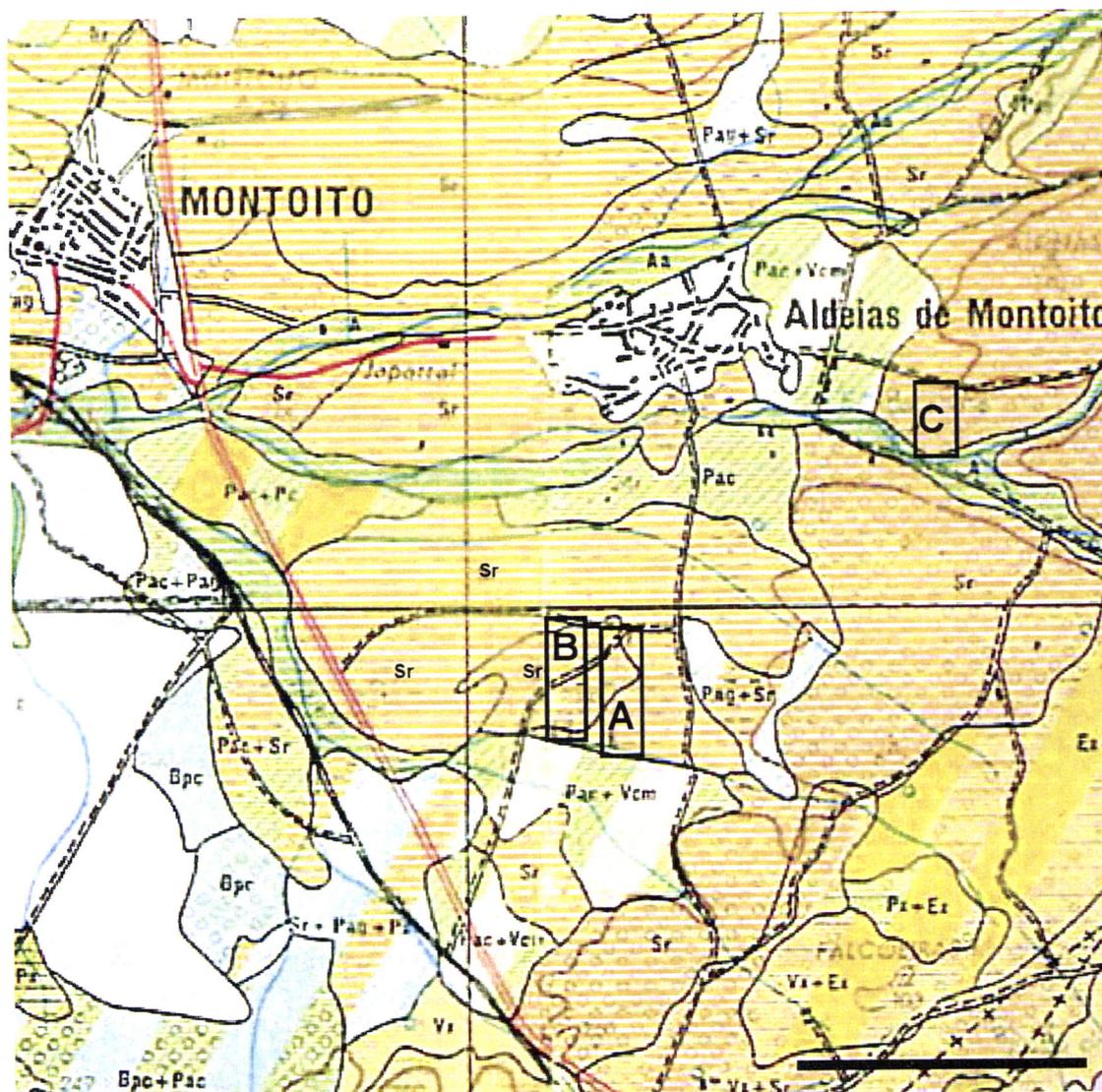


Figura 2.1 – Excerto da Carta de Solos de Portugal 40 B (escala 1 : 25 000; barra = 1 Km).

Os rectângulos representados pelas letras A, B e C correspondem aos locais onde foram recolhidas as amostras de solo para análise, designados, respectivamente, por Solo A (vinha com 16 tratamentos), Solo B (vinha com 10 tratamentos) e solo C (sem tratamentos prévios com o fungicida).

Os solos A e B estão localizados geograficamente a 1° 33' N e 38° 30' W e o solo C está situado a 1° 34' N e 38° 31' W e todos os solos em estudo pertencem administrativamente à freguesia de Montoito, concelho de Redondo e distrito de Évora estando, portanto, situados na região sul do Alto Alentejo.

e do potássio (K_2O) assimiláveis e determinação da capacidade de troca com doseamento dos cátions de troca: sódio, potássio, cálcio e magnésio.

A **análise textural**, frequentemente designada por **análise granulométrica**, consiste na determinação da proporção em que predominam as partículas minerais do solo.

Consoante as suas dimensões, as partículas minerais dividem-se em areia grossa (dimensões compreendidas entre 0,2 e 2 mm), areia fina (de 20 μm a 200 μm), limo (de 2 μm a 20 μm) e a argila (partículas com dimensões inferiores a 2 μm) de acordo com a *escala de Atterberg*, recomendada pela Sociedade Internacional da Ciência do Solo (Costa, 1979).

A análise granulométrica envolveu os seguintes passos: oxidação da matéria orgânica (com H_2O_2 a 60 volumes); dispersão das partículas por agitação mecânica com uma solução dispersante de hexametofosfato de sódio a 3,8% (p/v) e carbonato de sódio a 0,8% (p/v) em água, num agitador de hélice; crivagem simultânea da suspensão por dois crivos de malhas superiores a 0,2 mm e a 0,1 mm; determinação do peso seco das partículas com dimensões superiores a 0,1 mm e análise das partículas com diâmetros inferiores a 0,1 mm num sedimentógrafo de transmissão de raios X (Sedigraph 5100 da Micromeritics, 1988). Para a determinação da textura do solo as percentagens obtidas no sedimentógrafo foram convertidas em relação ao total de terra fina e foram calculadas as percentagens de areia grossa, areia fina, limo e argila para cada solo (Buchan *et al.*, 1993; Alexandre *et al.*, 2000).

O tipo de solo foi determinado utilizando o diagrama para classificação da textura adaptado aos limites internacionais das fracções granulométricas por M. Pereira Gomes e A. Antunes da Silva (*in* Costa, 1979).

O **pH do solo** foi determinado em suspensões na proporção de 1:2,5 (solo:água), através de um milivoltímetro modelo Crison micro pH 20011 com um eléctrodo de vidro combinado, utilizando o método potenciométrico de Schofield (*in* Hendershot *et al.*, 1993).

A **condutividade eléctrica** do solo foi determinada em suspensões na proporção de 1:5 (solo:água), pelo método potenciométrico, usando um condutivímetro Crison micro CM 2101 (Rhoades *et al.*, 1989). Após filtração do extracto com papel de filtro Whatman 42 efectuou-se a determinação da condutividade eléctrica no filtrado da amostra, tendo o sistema sido previamente calibrado com uma solução de KCl 0,01 M. Os resultados foram obtidos segundo a expressão:

$$\text{Condutividade eléctrica (mmhos/cm)} = \frac{K C}{[1 + 0,022 * (T - 25)]} * 1000$$

Nesta equação, K é a condutância ($\mu\delta \text{ cm}^{-1}$), C é a constante da célula e T é a temperatura da amostra ($^{\circ}\text{C}$).

A **matéria orgânica** foi determinada pelo método de Anne (1965) que consiste na oxidação do carbono orgânico, por uma solução de dicromato de potássio, em meio ácido e a quente, seguida da titulação do excesso do oxidante com uma solução de sulfato ferroso amoniacal designado frequentemente por sal de Mohr (Nelson & Sommers, 1982). O carbono orgânico do solo é oxidado, por destilação com o dicromato de potássio a 8% (p/v), em meio ácido, com formação de iões Cr^{3+} proporcional ao teor de carbono orgânico oxidado.

Uma alíquota do destilado, previamente filtrada com papel Whatman 42, foi titulada com o sal de Mohr 0,1M na presença de ácido fosfórico concentrado, utilizando a difenilamina a 2% (p/v) como indicador. Foi efectuado um ensaio em branco utilizando areia calcinada em vez de amostra de solo e seguindo o mesmo procedimento que a

amostra. A percentagem de matéria orgânica foi calculada multiplicando o factor 1,72 pela percentagem de carbono. Os resultados foram expressos em g de carbono orgânico por Kg de solo.

O **azoto na forma nítrica** foi determinado através do método potenciométrico tendo-se utilizado um milivoltímetro Crison pH Metros GLP 22 acoplado a um eléctrodo de referência de Ag/AgCl do tipo 373-90-WTE-ISE-S7, a uma sonda de temperatura e a um eléctrodo selectivo de nitratos Mettler tipo 15222300 (Dahnke, 1971). O eléctrodo foi calibrado com soluções padrão de nitrato de potássio nas concentrações de 0,01 M, 0,001M e 0,0001 M. Como estabilizante da força iónica utilizou-se uma solução de $\text{Ag}_2(\text{SO}_4)_3$ 0,9 M (solução de ISA - Ionic Strength Adjuster) que foi adicionada na proporção de 2/100. Utilizou-se o método de adição padrão no qual se adiciona às amostras uma solução que contém uma quantidade conhecida de NO_3^- (3 mg.L⁻¹). A concentração de azoto nítrico na amostra foi expressa em mg NO_3^- por Kg de solo.

O **azoto total** foi doseado pelo método de Kjeldahl, no qual o azoto orgânico é transformado em amónio por digestão com o ácido sulfúrico concentrado e o amónio é determinado a partir da concentração de amoníaco libertado por destilação (por arrastamento de vapor) do digesto em meio fortemente alcalino. O amoníaco libertado pela destilação foi recolhido numa solução de ácido bórico a 4% (p/v) formando amónia e H_2BO_3^- e o ião dihidrogenoborato foi titulado com ácido sulfúrico 0,05 M (*in* Bremner & Mulvaney, 1982). Foi efectuado um ensaio em branco nas mesmas condições da amostra. Sabendo que 1 mL de H_2SO_4 corresponde a 1,4008 mg de azoto, calculou-se a quantidade azoto na amostra por grama de solo. O resultado foi expresso em g de azoto por Kg de solo.

O **fósforo e o potássio** extractáveis foram determinados pelo método de Egner-Riehm, numa suspensão de 1:20 de solo com solução extractante de lactato de amónio e

ácido acético (Rhiem, 1958). A solução de Egner-Riehm (com valores de pH entre 3,65 e 3,75) permite a extracção simultânea das combinações fosfatadas do solo e do potássio de troca (*in* Kudsén, 1975).

O fósforo foi doseado por espectrofotometria a 650 nm. O extracto foi filtrado através de papel de filtro Whatman 2 e, a uma alíquota de 5 mL do filtrado foi adicionada 5 mL de solução complexante de molibdato de amónio 0,0024 M e de ácido ascórbico 0,015M. O fósforo reage com a solução de molibdato com formação de um complexo de fosfomolibdato de amónio, que na presença de ácido ascórbico foi reduzido a azul de molidnéio e quantificado num espectrofotómetro Hitachi U – 2000 (Greenberg *et al.*, 1992).

O doseamento do potássio efectuou-se através da permuta do ião potássio adsorvido pelo ião amónio da solução extractante e foi determinado por fotometria de emissão de chama num fotómetro de chama Jenway Ltd PFP 7 (Greenberg *et al.*, 1992).

A determinação da **capacidade de troca catiónica (T)** foi efectuada pelo método do Acetato de Amónio. Neste procedimento 10 g de solo foram tratados com 100 mL de acetato de amónio 1 M (ajustado a pH 7), com o objectivo de remover os **catiões de troca (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ e K^+)** que irão ficar no filtrado, após filtração com papel Whatman 42, onde serão posteriormente doseados (Rowell, 1994).

O resíduo foi submetido a uma pré-lavagem com etanol a 96% e, posteriormente, foi tratado com uma solução de KCl (1 M) acidificado ficando o ião NH_4^+ em solução, o qual foi submetido a uma destilação por arrastamento de vapor com NaOH a 35% e recolhido numa solução de ácido bórico a 2% (p/v). O destilado foi titulado com HCl (0,01M) e o volume de ácido gasto na titulação corresponde ao valor da capacidade de troca catiónica do solo (Thomas, 1982; Rowell, 1994). Os catiões cálcio e magnésio foram quantificados por espectrofotometria de absorção atómica em câmara de grafite

num espectrofotómetro Perkin Elmer 2380, usando o acetileno como gás de arraste e o ar comprimido com oxidante. O Mg^{2+} foi doseado a um comprimento de onda de 285,2 nm com uma lâmpada de cátodo oco de 6 mA e o Ca^{2+} foi doseado a um comprimento de onda de 422,7 nm com uma lâmpada de cátodo oco de 10 mA. Os catiões sódio e potássio foram doseados por fotometria de emissão de chama num fotómetro de chama Jenwayltd PFP7.

2.2.5. Estudo microbiológico

Para a caracterização das populações microbianas existentes nos diferentes tipos de solos, prepararam-se suspensões com alíquotas de cada um dos solos em soro fisiológico (NaCl 0,85% (p/v)) na proporção de 1:10. Estas suspensões foram colocadas sob agitação durante 2 horas a 180 r.p.m em agitador orbital a 25°C tendo sido seguido o esquema representado no fluxograma da **figura 2.2**.

Para a contagem e identificação dos microrganismos foi utilizado o método das diluições em placa tendo sido efectuadas diluições das suspensões de solos até 10^{-6} com água destilada estéril (Malloch, 1981; Wollum, 1982). Após homogeneização, 1mL de cada uma das diluições preparada foi inoculado em cinco placas de Petri contendo TSA ou CRB com cloranfenicol 0,01% (p/p) (**Anexo II - A**).

As placas de TSA foram incubadas a 30°C durante 48h para isolamento e contagem das bactérias. As placas de CRB foram incubadas a 25 °C durante 5 dias para contagem e isolamento dos fungos filamentosos e leveduras.

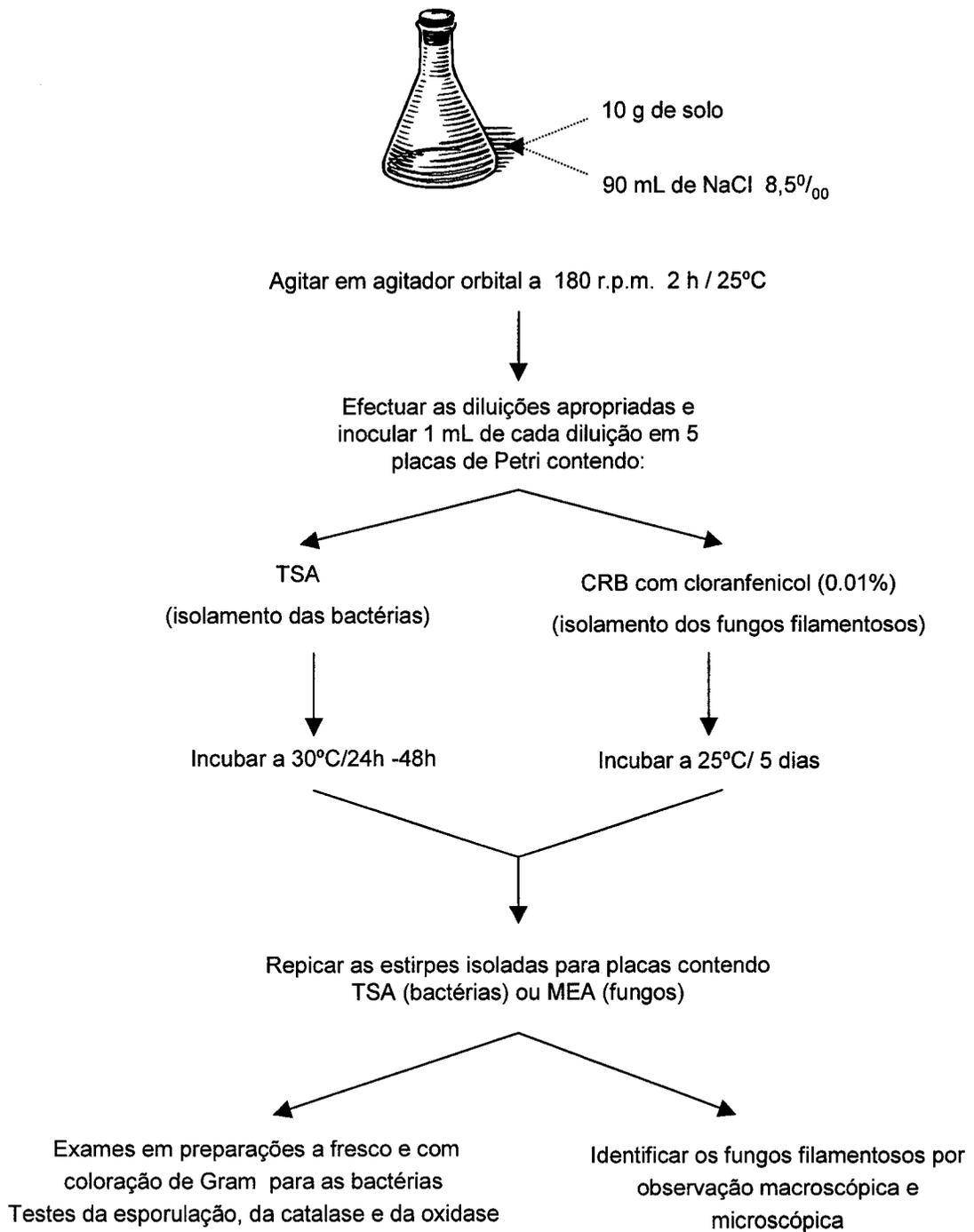


Figura 2.2 – Esquema geral do processo de isolamento dos microrganismos em amostras de solos.

A composição química de cada meio de cultura encontra-se descrita no **anexo II A**.

As colónias morfológicamente diferentes foram isoladas em novas placas contendo TSA (bactérias) ou MEA (fungos) e incubadas, respectivamente, a 30°C durante 24h ou a 25°C durante 5 dias.

De acordo com *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (in Krieg & Holt, 1984) efectuaram-se alguns testes, na tentativa de melhor caracterizar as bactérias isoladas. A morfologia das bactérias foi examinada em preparações a fresco e após coloração de Gram utilizando microscopia de contraste de fase e de campo claro, respectivamente. Para os microrganismos Gram positivo foram efectuados o teste de esporulação (sobrevivência à temperatura de 75°C) e o teste da catalase (peróxido de hidrogénio a 3% (v/v)). Para os bacilos que apresentaram o exame de Gram negativo foi efectuado o teste da oxidase utilizando o Kit Bactident Oxidase (Merck) que contem tiras de papel impregnadas com p-fenilenodiamina. Procedeu-se também à identificação das duas estirpes isoladas em simultâneo nos solos A e B usando galerias Biolog (Biolog MicroLog3 4.01C) tendo sido seguido o procedimento descrito no **anexo II - B**.

Os fungos filamentosos foram identificados por observação macroscópica das colónias em MEA e por observação microscópica das estruturas vegetativas e reprodutoras, utilizando-se chaves taxonómicas adequadas (Smith, 1969; Domsch *et al.*, 1980).

2.2.6. Manutenção dos organismos isolados

2.2.6.1. Armazenamento de curta duração

As estirpes bacterianas isoladas foram repicadas para tubos de ensaio contendo meio de Tryptic Soy Agar inclinado e, após incubação a 30°C durante 48h, foram

conservadas à temperatura de 4°C, sendo efectuadas repicagens periódicas de 2 em 2 meses. As estirpes fúngicas isoladas foram repicadas para tubos de ensaio contendo meio de Malt Extract Agar inclinado e, após incubação a 25°C durante 5 dias, foram conservadas à temperatura de 4°C, sendo efectuadas repicagens semestrais.

2.2.6.2. Armazenamento de longa-duração

Os microrganismos isolados foram também conservados pelo método da congelação em pérolas de vidro (ϕ médio de 2 mm) a -70°C. As culturas microbianas em rampas de 2 (bactérias) ou 5 dias (fungos) foram ressuspendidas em 5 mL de glicerol a 5% (p/v), utilizado como crioprotector. Após homogeneização, colocou-se 1 mL de suspensão de cada cultura em tubos de rosca de 2 mL contendo esferas de vidro previamente esterilizados por calor húmido em autoclave. Os tubos foram homogeneizados de forma a envolver todas as esferas de vidro com a suspensão microbiana, o excesso de suspensão foi retirado e os tubos foram colocados a -70°C numa arca (Polar 370 H).

Foi também efectuado o teste da viabilidade do método de congelação em pérolas de vidro, no qual, 7 dias após a congelação, foi removida uma pérola de cada tubo que foi ressuspendida em 100 μ L de soro fisiológico e, após homogeneização, a solução foi inoculada em placas de Petri contendo meio de TSA (bactérias) ou de MEA (fungos). As placas foram colocadas a incubar a 30°C/24h ou 25°C/5 dias, respectivamente, para observar se ocorreu crescimento. A viabilidade, quer para as bactérias quer para os fungos variou entre 98 – 100%.

2.2.7. Avaliação do perfil de biodegradação do metalaxil e do folpete

Neste estudo, o processo de biodegradação foi estudado em dois solos que tinham sido previamente expostos a tratamentos periódicos (solos A e B) e num solo sem exposição prévia (solo C) com o objectivo de observar se a biodegradação destes fungicidas pela população microbiana dos solos era facilitada pela exposição prévia ao fungicida comercial.

Para cada amostra de solo (A, B e C), foram estudadas três concentrações de produto comercial cuja formulação contém metalaxil (10% p/p) e folpete (40% p/p). A quantificação dos fungicidas metalaxil e folpete foi efectuada nas amostras de solos, periodicamente, durante 10 semanas por HPLC.

O procedimento foi repetido, nas mesmas condições de ensaio, para cada um dos solos após estes terem sido submetidos a esterilização em autoclave (controlos).

2.2.7.1. Condições de incubação

Cada amostra foi preparada em balões Erlenmeyer de 500 mL, adicionando gota a gota a quantidade adequada de fungicida comercial dissolvida em 2 mL de acetona a cerca de 25% da mistura de solo seleccionada para análise. Após evaporação do solvente, foi adicionada a restante quantidade de solo e homogeneizada a mistura de modo a obter-se uma amostra equivalente a 200 g de peso seco de solo com as concentrações finais de metalaxil e folpete em estudo. O fungicida foi dissolvido em acetona pelo facto de o metalaxil e o folpete apresentarem uma boa solubilidade neste solvente. A mistura de solo foi ajustada à capacidade de campo para prevenir quaisquer efeitos dos solventes na actividade biológica dos solos. As condições laboratoriais foram

estabelecidas de modo a minimizar a degradação abiótica, tendo os balões Erlenmeyer sido conservados ao abrigo da luz.

Para cada amostra de solo (**A**, **B** e **C**), foram estudadas três concentrações de fungicida comercial: 0,5, 1 e 2 mg por grama de peso seco de solo. Tendo presente a composição de cada um dos fungicidas na formulação comercial (**secção 2.2.1**) as concentrações em estudo equivalem, respectivamente, a 50 µg de metalaxil e 200 µg de folpete; 100 µg de metalaxil e 400 µg de folpete e a 200 µg de metalaxil e 800 µg de folpete por grama de solo. O conteúdo em humidade do solo foi mantido ao longo dos ensaios por adição de algumas gotas de água esterilizada em ambiente estéril. As amostras foram incubadas a 25°C ao abrigo da luz e analisadas periodicamente durante 10 semanas.

Amostras equivalentes de solo previamente autoclavado (30 minutos a 121°C em 3 dias consecutivos) e às quais foram adicionadas as mesmas concentrações de fungicida comercial foram usadas como controlo de degradação abiótica.

2.2.7.2. Preparação dos extractos

Alíquotas de solo (20 g) foram removidas de cada amostra após os vários períodos de incubação e agitadas durante 4 horas a 180 r.p.m., à temperatura ambiente, em frascos de Erlenmeyer contendo 50 mL de acetonitrilo. Os extractos foram filtrados através de membranas filtrantes de 0,45 µm e guardados a -20°C para posterior análise em HPLC.

O método de extracção foi previamente optimizado no que respeita à escolha do solvente e do tempo de extracção tendo em conta a solubilidade dos compostos, a estabilidade dos extractos e as percentagens de recuperação dos compostos a dosear. No método utilizado, o metalaxil e o folpete permaneceram estáveis nos extractos

conservados à temperatura de -20 °C durante pelo menos 30 dias e as percentagens de recuperação dos fungicidas nos extractos de solo foram de 97 ± 2 % para o metalaxil e de 95 ± 3 % para o folpete.

2.2.7.3. Quantificação dos fungicidas por HPLC

As amostras foram analisadas num cromatógrafo para cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) equipado com um injector Rheodyne de 20 μ L, uma bomba Merck Hitachi L-7100, uma coluna de fase reversa Merck Supersher 100 RP-18 (250x4,6 mm; 4 μ m), e pré-coluna Lichrospher 100 RP-18 e um detector Isco V₄ de UV/Vis Isco modelo V4R com sistema de aquisição e tratamento automático de dados pelo Software Star Chromatography Workstation 03-914401. As amostras e padrões foram eluídos, em modo isocrático, numa mistura de acetonitrilo e água ultrapura (1:1), durante 20 minutos, com um fluxo de 1 mL.min⁻¹, à temperatura de 25°C, e as leituras foram efectuadas a um comprimento de onda de 210 nm.

O metalaxil e o folpete foram identificados por comparação dos valores dos respectivos tempos de retenção dos padrões de metalaxil e folpete submetidos às mesmas condições experimentais e foram quantificados, pelo método de calibração por padrão externo, por interpolação gráfica das respectivas áreas de pico obtidas em curvas de calibração dos mesmos padrões para o intervalo de concentrações entre 0,5 e 6 mg.L⁻¹ para o metalaxil e 2 e 24 mg.L⁻¹ para o folpete (**Anexo III - A**). Para as amostras mais concentradas foram preparadas diluições com acetonitrilo.

2.2.7.4. Análise Estatística

Os estudos foram efectuados com o objectivo final de comparar a capacidade de biodegradação do metalaxil e folpete nos 3 solos em estudo (A, B e C). Foi utilizado um delineamento experimental no qual, após aplicação de três concentrações diferentes de

fungicida comercial contendo metalaxil (10% p/p) e folpete (40% p/p), se analisaram as taxas de degradação de cada um dos fungicidas em estudo para cada amostra de solo (A, B e C), tendo sido efectuadas quatro repetições para cada ensaio.

Para analisar os efeitos da presença da população residente na degradação dos fungicidas metalaxil e folpete e também da concentração de fungicida presente procedeu-se à análise de variância a dois factores fixos (ANOVA 2 factores tipo I) tendo sido comparadas as taxas de degradação de cada um dos fungicidas para cada solo e para cada concentração (Guimarães & Cabral, 1997; Bryman & Cramer, 2001; Maroco, 2003). A homogeneidade das variâncias populacionais foi confirmada pelo teste de Levene (Bryman & Cramer, 2001; Reis *et al.*, 2001).

A significância dos valores de F calculados, estabelece-se para $p < p_{\text{value}}$ (**Sig**) (p_{value} é o valor de probabilidade de se obter um valor igual ou superior a F se a hipótese nula é verdadeira). No caso presente, esta significância foi estabelecida para probabilidades inferiores a 0,01, considerando-se as diferenças entre médias significativas para probabilidades inferiores a 0,01 (p_{value} ou **Sig** < 0,01). Foram considerados como valores significativos aqueles cuja probabilidade de ocorrência foi superior a 99% ($p < 0,01$) e não significativos aqueles cuja probabilidade de ocorrência foi inferior a 95% ($p > 0,05$). Sempre que ocorreram diferenças significativas nos factores presentes nas análises de variância, a comparação múltipla de médias foi efectuada pelo teste de Tukey para determinar a sua significância estatística (Guimarães & Cabral, 1997; Reis *et al.*, 2001; Maroco, 2003).

Na validação dos resultados por análise de variância e comparação múltiplas de médias utilizou-se o programa SPSS para Windows, versão 11.0, *Copyright ©, Microsoft Corporation*.

2.2.8. Estudo do tipo de microrganismos (bactérias ou fungos) que mais contribuiu para o processo de degradação dos fungicidas metalaxil e folpete nas amostras de solo

Os estudos foram efectuados com suspensões preparadas a partir do solo que apresentou maior capacidade para degradar os fungicidas, designado anteriormente por **solo A**.

Utilizaram-se dois compostos anti-microbianos selectivos, o cloranfenicol (inibidor do crescimento bacteriano) e a cicloheximida (anti-fúngico), de modo a identificar qual dos dois microbiota (bactérias ou fungos) participaram mais activamente no processo de degradação dos fungicidas. O crescimento microbiano foi analisado indirectamente com base no consumo de oxigénio e na produção de CO₂, quantificados por GC.

O esquema do procedimento utilizado apresenta-se esquematizado na **figura 2.3**.

Num primeiro estudo, com o objectivo de estabelecer as condições experimentais, utilizou-se a glucose como fonte de carbono pelo facto de ser um substrato facilmente assimilável. Foram preparados quatro ensaios com suspensões de solo às quais foi adicionada glucose na concentração de 30 mg.mL⁻¹. Um dos ensaios foi utilizado como controlo para testar a resposta dos microrganismos do solo à glucose. Nos outros ensaios, as suspensões foram adicionadas de cloranfenicol ou de cicloheximida na concentração de 100 µg.mL⁻¹ ou de uma mistura dos dois antibióticos também na concentração de 100 µg.mL⁻¹.

Num segundo estudo, utilizou-se o fungicida comercial como fonte de carbono e não foram adicionados os antibióticos. Foram estudadas três concentrações de fungicida comercial 0,25, 0,5 e 1 mg.mL⁻¹ com o objectivo de determinar qual a concentração de fungicida mais adequada para o estudo posterior. Como controlo, foi efectuado um ensaio com uma suspensão de solo sem fungicida.

E s t u d o 1	Ensaio 1	Suspensão de solo + glucose (3 g – 20 mL H ₂ O) (30 mg/mL)
	Ensaio 2	Suspensão de solo + glucose + cloranfenicol (30 mg/mL) (100 µg/mL)
	Ensaio 3	Suspensão de solo + glucose + cicloheximida (30 mg/mL) (100 µg/mL)
	Ensaio 4	Suspensão de solo + glucose + (cloranfenicol + cicloheximida) (30 mg/mL) (100 µg/mL)
E s t u d o 2	Ensaio 1	Suspensão de solo (3g solo – 20 mL H ₂ O)
	Ensaio 2	Suspensão de solo + fungicida (0,25 mg/mL)
	Ensaio 3	Suspensão de solo + fungicida (0,5 mg/mL)
	Ensaio 4	Suspensão de solo + fungicida (1 mg/mL)
E s t u d o 3	Ensaio 1	Suspensão de solo
	Ensaio 2	Suspensão de solo + fungicida comercial+ cloranfenicol (3 g – 20 mL H ₂ O) (0,25 mg/mL) (100 µg/mL)
	Ensaio 3	Suspensão de solo + fungicida + cicloheximida (3 g – 20 mL H ₂ O) (0,25 mg/mL) (100 µg/mL)
	Ensaio 4	Suspensão de solo + fungicida + (cloranfenicol + cicloheximida) (3 g – 20 mL H ₂ O) (0,25 mg/mL) (100 µg/mL)

Nota: O fungicida aplicado contém metalaxil (10 % p/p) e folpete (40 % p/p)

Figura 2.3 - Esquema do procedimento utilizado para avaliação do grupo de microbiota que mais contribui para a degradação dos metalaxil e folpete em solos.

Por último, procedeu-se ao estudo 3 para avaliar qual a população (bacteriana ou fúngica) que participava mais activamente no processo de degradação. As suspensões de solo contendo fungicida comercial na concentração de $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$ foram adicionados dos antibióticos na concentração de $100 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$, tendo sido efectuados ensaios com cloranfenicol, com cicloheximida e com uma mistura de ambos (1:1).

2.2.8.1. Condições de Incubação

As suspensões de solo contendo 3 g de solo em 20 mL de água estéril foram adicionadas das restantes substâncias, consoante os ensaios, em frascos de 100 mL aos quais se adaptou uma rolha de borracha para impedir as trocas gasosas e procedeu-se à selagem com cápsula de alumínio de forma a tornar o sistema completamente fechado. Nos ensaios com fungicida, este foi dissolvido em 100 μL de acetona e os frascos foram inicialmente rolhados com algodão para que a acetona evaporasse e só posteriormente é que foram colocadas as rolhas de borracha e se efectuou a selagem com cápsula. As amostras foram incubadas a 30°C com uma agitação de 180 rotações por minuto (r.p.m.) no escuro durante o tempo de ensaio.

2.2.8.2. Determinação do CO_2 e O_2

As determinações de CO_2 e O_2 na fase gasosa das culturas foram efectuadas num cromatógrafo HACH CARLE, modelo 100AGC, equipado com detector de condutividade térmica, com um forno regulado para 40°C e duas colunas de cromatografia de exclusão molecular (Alltech). A fase móvel utilizada foi constituída por Hélio C-50 (Gasin) a um fluxo de 20 mL/min. A separação foi feita por peneiro molecular em colunas de enchimento, tendo sido utilizada uma coluna com suporte SIV BX e partículas de 45-60 mesh de 3 m de comprimento e diâmetro interno de 2,2 mm para o doseamento do O_2 e uma coluna com suporte Porada KP e partículas de 80 -100 mesh de diâmetro interno de

2,2 mm e 2 m de comprimento para a análise do CO₂. As quantidades de cada um dos gases em análise foram determinadas com base nas áreas dos respectivos picos cromatográficos, calculadas num integrador da marca Hewlett Packard, modelo 3390A.

A padronização do cromatógrafo para análise do oxigénio foi efectuada injectando volumes crescentes de ar ambiental no cromatógrafo (50, 100, 150, 200 e 250 µL). Para quantificação do CO₂ adicionaram-se quantidades conhecidas de CO₂ (C-45, Gasin) em frascos, nos quais se fez, previamente, passar um fluxo de azoto (C-50, Gasin) durante 30 minutos. Os volumes de CO₂ adicionados nos frascos foram de 2, 5, 10, 15 e 20 mL e, após agitação, foram retiradas alíquotas de 200 µL para injeção no cromatógrafo.

As colheitas para a determinação do oxigénio e do dióxido de carbono foram efectuadas na fase gasosa das culturas às 0 horas e após 12h, 24h, 48h, 72 h e diariamente até se ultrapassar a fase exponencial de crescimento das culturas. Alíquotas de 200 µL foram colhidas em condições de assepsia, nos intervalos de tempo referidos, injectadas no cromatógrafo com uma seringa para cromatografia gasosa de 500 µL equipada com uma válvula retentora de pressão ("gas-tight-SGE") e com uma agulha hipodérmica estéril e analisadas por cromatografia gás-sólido.

2.2.8.3. Quantificação dos microrganismos

No final de cada um dos ensaios foi efectuada uma análise semi - quantitativa dos microrganismos nas suspensões de solo pelo método da diluição em placa em meios específicos de TSA e CRB, como foi descrito no **ponto 2.2.5**.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Estudo físico-químico

As características físico-químicas dos solos em análise encontram-se apresentadas na **tabela 2.1**.

Na análise granulométrica os valores de cada um dos minerais de argila variaram respectivamente, entre 19,1% e 23,8% para a fracção de areia grossa, 15,8 e 22,4% para a areia fina, 21,83 e 27,2 para o limo e 31,6% e 37% para a argila. Os três solos em estudo apresentaram textura franco-argilosa, tendo em conta as percentagens de areia, limo e argila, através do diagrama para classificação da textura referido na **secção 2.2.4**.

Os valores de pH dos três solos em estudo foram próximos da neutralidade, tendo variado entre 6,5 e 7,3. Os valores de condutividade eléctrica variaram entre 0,03 e 0,06 mmhos.cm⁻¹. Os solos A e B apresentaram valores de matéria orgânica de 12 g.Kg⁻¹ e o solo C de 15 g.Kg⁻¹. Os valores de fósforo (P₂O₅) foram muito baixos tendo o solo B apresentado um valor de 7 mg.Kg⁻¹ e os solos A e C valores de 17 e 16 mg.Kg⁻¹, respectivamente. Os valores de azoto nítrico foram semelhantes nos três solos mas observou-se variação nos valores de azoto total tendo sido o solo C o solo que apresentou um valor superior (0,9 g.Kg⁻¹) e o solo A o que apresentou o menor valor (0,1 g.Kg⁻¹). Os valores de potássio variaram entre 60 e 144 mg.Kg⁻¹.

Os valores da capacidade de troca catiónica foram de 19,7 cmol_c.Kg⁻¹ para o solo A e de 16,1 e 16,7 cmol_c.Kg⁻¹ para os solos B e C, respectivamente. O solo C apresentou uma concentração superior em ião Ca²⁺ (troca) do que os solos A e B e valores inferiores em iões Mg²⁺. Os valores do K⁺ (troca) foram de 19,7 cmol_c.Kg⁻¹ para o solo A e de 16,1 e 16,7 cmol_c.Kg⁻¹ para os solos B e C, respectivamente. Os valores em iões Na⁺ de troca foram iguais nos três solos.

Tabela 2.1 - Caracterização físico-química dos solos em estudo: **Solo A** (vinha com 16 tratamentos), **Solo B** (vinha com 10 tratamentos) e **Solo C** (sem tratamentos prévios com o fungicida). Os resultados representam a média de três replicados de cada amostra de solo.

Parâmetros estudados		Solos em análise		
		A	B	C
Análise granulométrica	Areia grossa	23.07 %	19.10 %	23.81 %
	Areia fina	22.36 %	22.03 %	15.80 %
	Limo	21.83 %	27.24 %	23.43 %
	Argila	32.75 %	31.63 %	36.96 %
	Textura	franco-argilosa	franco-argilosa	franco-argilosa
	pH (H ₂ O)	7.0	7.3	6.5
	Condutividade eléctrica (mmhos/cm)	0,06	0,04	0,03
	Matéria orgânica (g.Kg ⁻¹)	12.0 ****	12.0 ****	15.0 ****
	Fósforo (P ₂ O ₅) (mg .Kg ⁻¹)	17.00 **	7.00 *	16.00 **
	Azoto (NO ₃ ⁻) (mg .Kg ⁻¹)	19.00	17.00	16.00
	Azoto Total (g.Kg ⁻¹)	0.1	0.6	0.9
	Potássio (K ₂ O) (mg.Kg ⁻¹)	144.00 *****	118.00 ****	60.00 ***
	Cap. Troca (cmol _(c) .Kg ⁻¹)	19,7	16,1	16,7
	Cálcio _(troca) (cmol _(c) .Kg ⁻¹)	5,88	6,14	8,19
	Magnésio _(troca) (cmol _(c) .Kg ⁻¹)	3,44	3,23	1,25
	Sódio _(troca) (cmol _(c) .Kg ⁻¹)	0,22	0,22	0,22
	Potássio _(troca) (cmol _(c) .Kg ⁻¹)	0,32	0,29	0,13

muito baixo, ** baixo, *** médio, **** alto, ***** muito alto

2.3.2. Estudo microbiológico

Os resultados obtidos encontram-se expressos nas **tabelas 2.2 a 2.4**.

Na **tabela 2.2** estão registados os valores médios das unidades de formação de colónias obtidas por grama de solo para a população bacteriana e para a população fúngica de cada um dos solos.

Os valores da população bacteriana variaram entre $1,9 \times 10^6$ e $1,5 \times 10^7$ ufc.g⁻¹, tendo sido o solo C o que apresentou o valor mais elevado de população bacteriana. Os valores obtidos para a população fúngica oscilaram entre $3,2 \times 10^4$ e $8,2 \times 10^4$ ufc.g⁻¹ solo tendo também sido observado o valor mais elevado no solo C.

Tabela 2.2 - Média de unidades de formação de colónias total (ufc) por grama de solo em TSA (população bacteriana) e em CRB com cloranfenicol (população fúngica).

Solos em estudo	Bactérias (ufc.g ⁻¹ solo)	Fungos (ufc.g ⁻¹ solo)
A	1.90×10^6	3.2×10^4
B	1.26×10^7	2.4×10^4
C	1.49×10^7	8.2×10^4

Na **tabela 2.3** são apresentadas algumas das características observadas na população bacteriana isolada. Devido ao elevado número de bactérias isoladas e uma vez que o objectivo principal desta dissertação foi a obtenção de estirpes fúngicas para posterior aplicação em solos, procedeu-se apenas a uma caracterização preliminar

Tabela 2.3 – Algumas características dos microrganismos isolados em TSA. As letras correspondem aos solos dos quais as bactéria foram isoladas. Os índices numéricos representam as diferentes espécies isoladas.

(+ teste positivo; – teste negativo; nd – não determinado)

Bactérias	Exame Fresco 40 x /100x	Exame de Gram	Testes da catalase / oxidase		Teste da esporulação
A ₁	Bacilos médios com esporos centrais	+	+	nd	+
A ₂	Bacilos grandes com alguns esporos	+	+	nd	+
A ₃	Bacilos isolados e aos pares	+	+	nd	+
A ₄	Bacilos isolados, compridos e finos	–	+	–	nd
A ₅	Bacilos muito grandes isolados e em cadeias com esporos cilíndricos ou ovais	+	+	nd	+
A ₆	Bacilos pequenos e aos pares	+	+	nd	+
A ₇	Cocobacilos pequenos	+	+	nd	–
A ₈	Cocos isolados e aos pares	+	+	nd	nd
A ₉	Bacilos pequenos	–	+	–	nd
B ₁	Actinomicetes	+	nd	nd	nd
B ₂					
B ₃	Bacilos grandes aos pares e em cadeias	+	+	nd	+
B ₄	Bacilos com esporos cilíndricos ou ovais	+	+	nd	+
B ₅	Bacilos com esporos subterminais	+	+	nd	+
B ₆	Bacilos isolados, compridos e finos	–	+	–	nd
B ₇	Bacilos médios com esporos ovais	+	+	nd	+
B ₈	Cocos isolados e aos pares	+	+	nd	+
B ₉	Bacilos pequenos isolados	–	+	+	nd
B ₁₀	Bacilos com esporos ovais deformantes	+	+	nd	+
C ₁	Bacilos isolados com esporos subterminais	+	+	nd	+
C ₂	Bacilos isolados com esporos centrais	+	+	nd	+
C ₃	Bacilos pequenos, imóveis	+	+	nd	+
C ₄	Bacilos aos pares e em cadeias	+	+	nd	+
C ₅	Bacilos com esporos centrais deformantes	+	+	nd	+

baseada em exames microscópicos a fresco e com coloração de Gram e foram efectuados alguns testes mais comuns, como foi referido na **secção 2.2.5**.

De acordo com as características morfológicas observadas nas culturas em TSA e também nos exames microscópicos a fresco e com coloração de Gram, foram identificadas 9 estirpes diferentes de bactérias no solo A, 10 no solo B e 5 no solo C, designadas por índices numéricos.

No **solo A** foram isoladas 8 estirpes de bactérias com morfologia bacilar e uma estirpe com morfologia de cocos. As estirpes designadas por **A₄** e **A₉** apresentaram resposta negativa ao exame de Gram e o teste da oxidase negativo. A estirpe designada por **A₈**, composta por cocos, apresentou o exame de Gram positivo e o teste do catalase negativo.

No **solo B** foram identificadas 2 estirpes de actinomicetes (tendo em contra as características morfológicas das colónias isoladas), 7 estirpes em forma de bacilos (duas Gram negativas e cinco Gram positivas) e uma estirpe composta por cocos. As 5 estirpes de bacilos Gram positivas apresentaram os testes da esporulação e da catalase positivos. A estirpe designada por **B₆** apresentou forma bacilar e características morfológicas semelhantes à estirpe designada por **A₄** e apresentou resposta negativa ao exame de Gram negativo e os testes da catalase positivo e da oxidase negativo. A estirpe designada por **B₉** também com forma bacilar apresentou os testes da catalase e da oxidase positivos. Os cocos (**B₈**) apresentaram reacção positiva ao Gram, características morfológicas semelhantes às da estirpe **A₈**, isolada no **solo A**, e o teste da catalase positivo.

No **solo C** foram identificadas 5 estirpes com morfologia bacilar apresentando reacção positiva ao exame de Gram e os testes da esporulação e da catalase positivos.

Como mostra a **tabela 2.3**, um elevado número das espécies isoladas nos três solos são bacilos Gram positivos produtores de esporos quando cultivados em aerobiose e apresentaram os testes da esporulação e da catalase positivos, pertencendo muito provavelmente ao género *Bacillus*, que são, aliás, os bacilos esporulados mais predominantes nos solos.

Duas das estirpes bacterianas foram isoladas, em simultâneo, nas amostras dos dois solos que apresentaram maior capacidade de degradação (solos A e B). Por conseguinte, a estirpe **A₄** isolada no solo A corresponde à estirpe **B₆** isolada no solo B, da mesma forma que, a estirpe **A₈** (solo A) corresponde à estirpe **B₈** (solo B).

Como estas duas estirpes estavam presentes nos solos que apresentaram uma degradação facilitada (solos A e B) e não se encontraram no solo C, procedeu-se à identificação destas duas estirpes usando galerias de Biolog e o sistema Biolog MicroLog3 4.01 C (**Anexo II – B**). Assim, a estirpe inicialmente designada por **A₄** (solo A) e por **B₆** (solo B) foi identificada como *Enterobacter cloacae* com um grau de probabilidade de 99% e a estirpe inicialmente designada por **A₈** (solo A) e **B₈** (solo B) foi identificada como *Stapylococcus arlettae*, com um grau de probabilidade de 100%, de acordo com o método utilizado (Biolog MicroLog3 4.01 C).

Na **tabela 2.4** estão registados os fungos filamentosos mais frequentes em cada uma das amostras de solos. Nesta tabela, apresenta-se uma lista das espécies isoladas, a amostra de solo em que foram encontradas e o número de isolados (total acumulado do número de colónias obtidas durante o processo de isolamento). O estudo da **população fúngica** presente nos três solos levou à obtenção de 276 isolados correspondentes a 14 espécies de fungos filamentosos.

Nas estirpes designadas por micélio estéril só se observou crescimento vegetativo e não foram encontradas estruturas reprodutoras que permitissem o seu agrupamento

em géneros. No entanto, baseado nas características macromorfológicas das colónias (diâmetro das colónias, textura e densidade do micélio, presença ou não de pigmentos e coloração dos conídios) foi possível separar quatro tipos diferentes de micélio estéril (sterile mycelium) que foram designados por índices numéricos com ordem arbitrária.

As espécies pertencentes aos géneros *Aspergillus* e *Penicillium* baseado nas diferentes características macromorfológicas das colónias foram separadas, respectivamente, em 2 e 3 espécies diferentes, designadas por índices numéricos, uma vez que não foram efectuados os testes específicos para a identificação da espécie.

A frequência das espécies fúngicas foi variável consoante os solos em estudo, como se observa na **tabela 2.4**, tendo-se observado uma maior diferença no solo que nunca foi submetido a tratamentos (**solo C**) relativamente aos solos com cultura de vinha (**solos A e B**). As espécies mais frequentes no **solo C**, nomeadamente as estirpes de *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp. 3 e *Aspergillus* sp. 2 foram isoladas com uma frequência muito baixa nos solos com cultura de vinha.

Também se observou que existe uma semelhança entre a frequência de espécies fúngicas nos dois solos com vinha (**solos A e B**), nos quais as espécies *Aspergillus niger*, *Rhizopus stolonifer* e a espécie designada por micélio 3 foram as mais frequentes e que, à excepção do *Aspergillus niger*, não se encontraram presentes no solo C.

Deste modo, é possível que a frequência das estirpes esteja associada a um processo de selecção que esteja relacionado com a aplicação de fungicidas, podendo as estirpes mais frequentes apresentar uma maior resistência e/ou capacidade de degradação dos fungicidas.

Tabela 2.4 – Registo das diferentes populações de fungos filamentosos isolados e da frequência com que ocorrem. Considerou-se como frequência o número de isolados (colónias) de cada espécie que foi obtido em 0,2 mL (por placa de Petri) na diluição de 10^{-3} em meio CRB. Os valores representam a média de 3 ensaios.

Fungos Filamentosos	Média da frequência das colónias		
	Solo A	Solo B	Solo C
<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem.	10	9	16
<i>Aspergillus</i> sp. 1	4	2	--
<i>Aspergillus</i> sp. 2	--	2	18
<i>Cladosporium</i> sp.	--	--	82
<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht	5	4	2
<i>Gliocadium catenulatum</i> Gilman e Abbott	1	1	---
Micélio estéril 1	3	4	--
Micélio estéril 2	6	2	--
Micélio estéril 3	14	6	--
Micélio estéril 4	2	2	8
<i>Penicillium</i> sp. 1	4	2	--
<i>Penicillium</i> sp. 2	3	4	--
<i>Penicillium</i> sp. 3	2	2	38
<i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehremb.) Lind	10	8	--
Total de isolados em cada solo	64	48	164

2.3.3. Biodegradação do metalaxil e do folpete

De forma a determinar qual dos três solos estudados apresentou maior capacidade para degradar os fungicidas metalaxil e folpete, foram analisadas as concentrações de metalaxil e de folpete remanescentes para os três solos e para as três concentrações de fungicida em estudo durante 10 semanas. Ambos os fungicidas foram adicionados sob a forma do produto comercial que contém, como já se referiu, 10% (p/p) de metalaxil e 40% (p/p) de folpete.

Na **figura 2.4** apresentam-se, como exemplo, os cromatogramas obtidos aos 0 e 42 dias para o solo A para a concentração de fungicida comercial de $0,5 \text{ mg.g}^{-1}$ de solo, que corresponde a $50 \text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$ de metalaxil.

Como o produto comercial contém na sua formulação uma concentração de folpete quatro vezes superior à de metalaxil a área de pico obtido para o metalaxil é bastante inferior à obtida para o folpete. Para obter reprodutibilidade nos resultados, os padrões para a construção da curva de calibração foram preparados tendo em conta as proporções dos fungicidas presentes nas amostras, como se referiu na **secção 2.2.7.3**.

Os perfis dos cromatogramas obtidos por análise das amostras dos solos B e C e no ensaio em que se utilizaram amostras de solos previamente autoclavado (controlos) foram semelhantes aos apresentados para o solo A, variando apenas nas áreas dos picos cromatográficos referentes aos fungicidas metalaxil e folpete. Para as concentrações mais elevadas, para obter picos gaussianos para os dois compostos em análise, procedeu-se à diluição dos extractos com acetonitrilo tendo-se obtido cromatogramas semelhantes aos aqui apresentados.

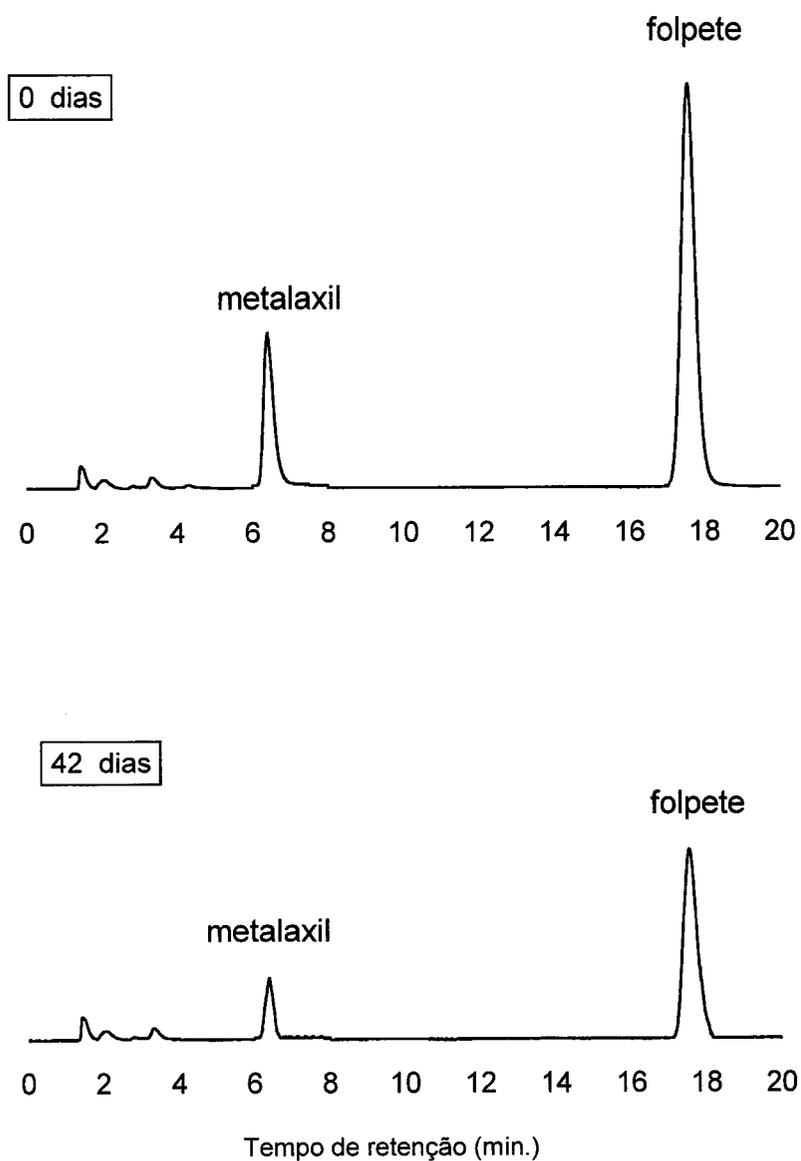


Figura 2.4 – Cromatogramas obtidos aos 0 dias e após 42 dias de incubação para o solo A para a concentração de 0,5 mg de fungicida comercial por grama de solo (p.s).

T_R metalaxil - 6,4 min; T_R folpete - 17,6 min

2.3.3.1. Biodegradação do metalaxil nos solos

O processo de degradação do metalaxil foi estudado em amostras de três solos após adição de três concentrações de fungicida comercial, equivalentes a 200, 100 e 50 μg de metalaxil por grama de solo. Os valores da quantidade de metalaxil degradado aos 0, 42 e 72 dias de incubação estão apresentados na **tabela 2.5**. O controlo corresponde aos valores médios de metalaxil degradado obtidos, para cada uma das concentrações em estudo, nos três solos que tinham sido previamente autoclavados, uma vez que se observou que, para uma mesma concentração, os valores de metalaxil nas amostras dos três solos sem população microbiana residente, foram muito próximos.

Tabela 2.5 - Registo da quantidade de metalaxil degradado por grama de solo (peso seco) aos 0, 42 e 70 dias de incubação nos três solos e para as três quantidade de fungicida comercial aplicadas. Os valores representam a média de 4 replicados \pm desvio padrão.

Fungicida comercial (mg.g^{-1} solo)	Metalaxil adicionado ($\mu\text{g.g}^{-1}$ solo)	Tempo incub. (dias)	Metalaxil degradado ($\mu\text{g.g}^{-1}$ solo)			
			Solo A	Solo B	Solo C	Controlo
2	200	0	2,7 \pm 0,9	2,1 \pm 1,2	1,3 \pm 0,4	0,8 \pm 0,5
		42	51,4 \pm 0,9	34,8 \pm 0,9	18,7 \pm 1,4	7,6 \pm 0,9
		70	60,6 \pm 0,9	45,4 \pm 1,2	25,6 \pm 0,4	11,1 \pm 1,4
1	100	0	0,4 \pm 0,2	0,2 \pm 0,2	0,3 \pm 0,2	0,4 \pm 0,3
		42	28,5 \pm 0,4	20,1 \pm 0,5	10,3 \pm 0,4	4,3 \pm 0,3
		70	33,6 \pm 0,5	26,3 \pm 0,5	13,5 \pm 0,8	5,3 \pm 0,5
0,5	50	0	0,2 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1
		42	15,8 \pm 0,1	11,7 \pm 0,1	6,4 \pm 0,2	1,6 \pm 0,1
		70	18,5 \pm 0,2	15,2 \pm 0,2	7,7 \pm 0,3	2,4 \pm 0,3

Para avaliar o comportamento da degradação do metalaxil em função do tempo apresentam-se os perfis de degradação obtidos para os três solos em estudo e para o controlo (média dos solos autoclavados), para cada uma das concentrações estudadas (**Figura 2.5**). Como se pode observar nesta figura, os perfis de degradação apresentaram uma relação linear ($r^2 > 0,997$) entre a percentagem de degradação do metalaxil e o tempo até aos 42 dias de incubação para os três solos e para as três concentrações em estudo. No entanto, a partir dos 42 dias de incubação observou-se uma diminuição da degradação gradual até aos 70 dias.

A percentagem de degradação de metalaxil observada aos 42 dias de incubação, para a concentração de fungicida comercial de 2 mg.g^{-1} solo (**tabela 2.5** e do **gráfico 1 da figura 2.5**) foi de 26% ($51,4 \text{ } \mu\text{g}$) no solo da vinha que tem um maior historial de tratamentos com o fungicida (solo A), de 17% ($34,8 \text{ } \mu\text{g}$) no outro solo com cultura de vinha (solo B) e de 9% ($18,7 \text{ } \mu\text{g}$) no solo que não tinha sido previamente exposto ao fungicida (solo C). O controlo (média dos valores obtidos nas amostras de solo autoclavado) apresentou um valor médio de 4% de degradação ($7,6 \text{ } \mu\text{g}$) aos 42 dias de incubação. Aos 70 dias (final do ensaio), a percentagem de metalaxil degradado foi de 30% para o solo A, 23% para o solo B, 13% para o solo C e de 6% para o controlo.

Para a concentração de fungicida comercial de 1 mg.g^{-1} solo (**tabela 2.5** e **gráfico 2 da figura 2.5**), aos 42 dias de incubação, a percentagem de metalaxil degradado foi de 29% ($28,5 \text{ } \mu\text{g}$) para o solo A, de 20% ($20,1 \text{ } \mu\text{g}$) para o solo B, de 10% ($10,3 \text{ } \mu\text{g}$) para o solo C e de 5% ($4,3 \text{ } \mu\text{g}$) para o controlo. Aos 70 dias, a percentagem de metalaxil degradado foi de 34% para o solo A, 27% para o solo B, de 14% para o solo C e de 6% para as amostras de solo sem população residente (controlo).

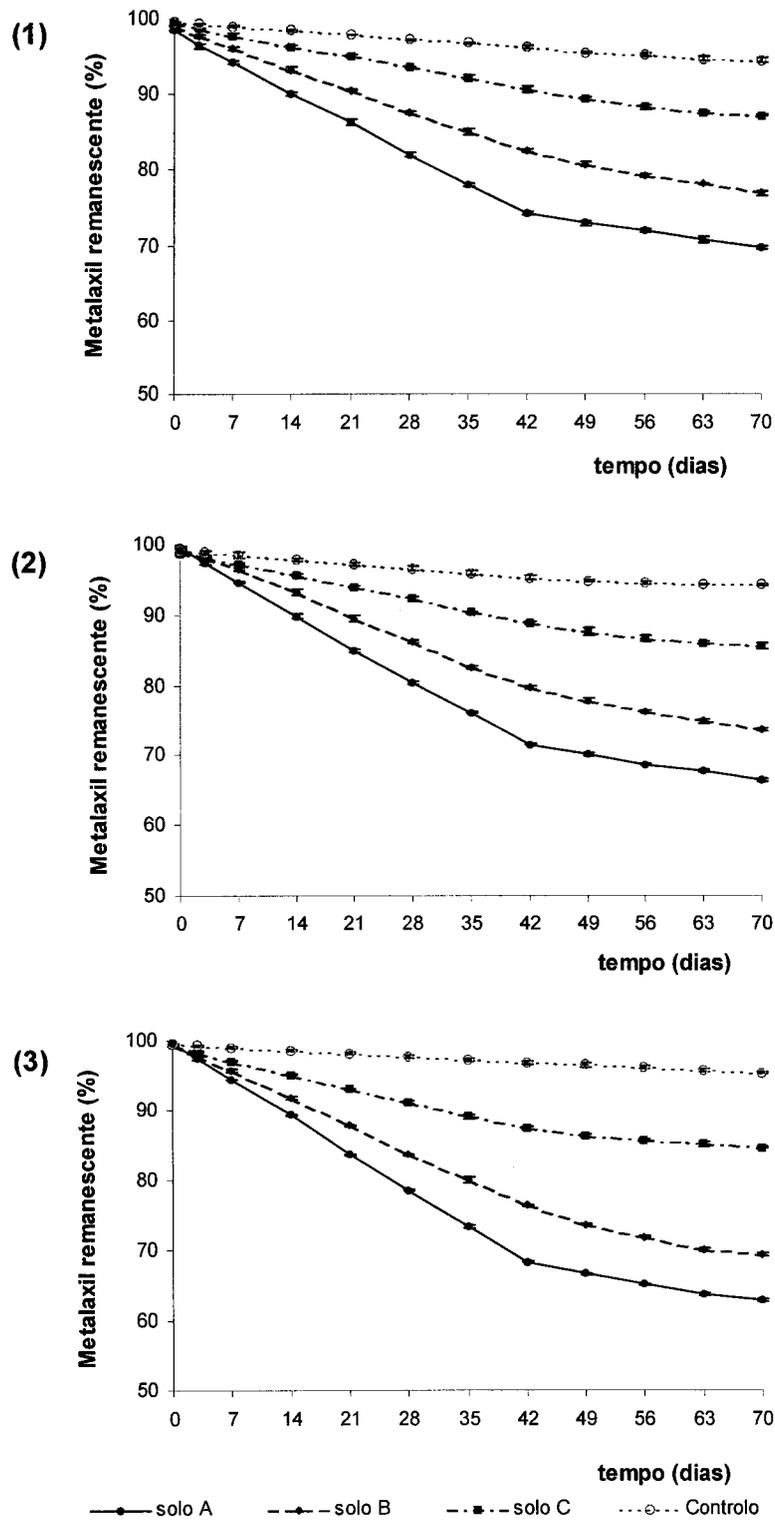


Figura 2.5 - Degradação do metalaxil nos solos em estudo com diferentes concentrações de fungicida comercial aplicadas: (1) 2 mg.g⁻¹ solo; (2) 1 mg.g⁻¹ solo e (3) 0,5 mg.g⁻¹ solo. Os valores correspondem à média de quatro replicados.

Para a concentração de fungicida comercial de $0,5 \text{ mg.g}^{-1}$ solo (**tabela 2.5 e gráfico 3 da figura 2.5**), aos 42 dias de incubação, a percentagem de metalaxil degradado para os solos com cultura de vinha A e B foi respectivamente de 32% e de 24% e para o solo sem exposição prévia ao fungicida foi de 13%. A degradação do metalaxil aos 42 dias nos solos autoclavados foi de 3% ($0,3 \mu\text{g}$) para a concentração em estudo. Aos 70 dias, a percentagem de metalaxil degradado foi de 37% para o solo A, 31% para o solo B e de 15% para o solo C.

As taxas de degradação calculadas para o período linear de degradação (0 - 42 dias) para cada solo e para cada concentração em estudo são apresentadas na **tabela 2.6** expressas em μg de metalaxil degradado por dia por grama de peso seco de solo.

Tabela 2.6- Taxas de degradação do metalaxil expressas em $\mu\text{g.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. Os valores representam a média dos 4 replicados \pm desvio padrão.

Fungicida comercial (mg.g^{-1} solo)	Metalaxil ($\mu\text{g.g}^{-1}$ solo)	Solo A	Solo B	Solo C	Controlo
		(μg de metalaxil . g^{-1} solo. dia^{-1})			
2	200	$1,146 \pm 0,003$	$0,771 \pm 0,003$	$0,402 \pm 0,002$	$0,162 \pm 0,002$
1	100	$0,659 \pm 0,001$	$0,487 \pm 0,004$	$0,245 \pm 0,002$	$0,090 \pm 0,003$
0,5	50	$0,371 \pm 0,003$	$0,278 \pm 0,002$	$0,140 \pm 0,003$	$0,033 \pm 0,001$

A análise de variância (**Anexo IV-A**) dos resultados obtidos nas amostras de solo em estudo mostrou que a variação da taxa de degradação foi significativa para cada uma das concentrações ($p < 0,01$) e, que, para cada uma destas concentrações houve uma variação significativa da degradação com o tipo de amostra de solo ($p < 0,01$).

Os testes de comparação múltipla de médias, efectuados pelo método de Tukey mostraram que as médias foram significativamente diferentes em cada um dos três solos em estudo. Pela análise dos resultados obtidos, observou-se que a degradação do metalaxil foi superior nos solos com cultura de vinha que já tinham sido submetidas a tratamento prévio com a formulação comercial que contém este fungicida (**solos A e B**) do que no solo que não tinha sido submetido a exposições com o fungicida, e que o solo que apresentou maior degradação foi o solo cujas culturas já tinham sido submetidas a um maior número de tratamentos com o referido fungicida (**solo A**).

A análise de variância (**Anexo IV-A**) da taxa de degradação do metalaxil nos solos autoclavados (controlos) mostrou que a variação foi significativa para cada uma das concentrações ($p < 0,01$). No entanto, a degradação do metalaxil nos solos sem população residente foi independente do tipo de amostra de solo em estudo (A, B ou C), pelo que a para a diferença obtida para o tipo de amostra de solo não foi significativa ($p = 0,782$).

2.3.3.2. Biodegradação do folpete nos solos

O estudo da degradação do folpete foi efectuado nas amostras dos três solos após adição de três concentrações de fungicida comercial de 2, 1 e 0,5 mg.g⁻¹ solo, correspondentes a 800, 400 e 200 µg de folpete, respectivamente. Os valores da quantidade de folpete degradado aos 0, 42 e 72 dias de incubação estão apresentados na **tabela 2.7**. Como se observou que nas amostras dos três solos sem população microbiana residente (solos previamente autoclavados), para uma mesma concentração, os valores de folpete degradado em cada intervalo de tempo foram muito próximos, calculou-se o valor médio de cada um desses valores (controlo).

Os perfis de degradação do folpete em função do tempo, dos três solos em estudo e do controlo (média dos solos autoclavados), encontram-se representados na **figura 2.6**.

Tabela 2.7 - Registo da quantidade de folpete degradada por grama de solo (peso seco) aos 0, 42 e 70 dias de incubação nos três solos e para as três quantidades de fungicida comercial aplicadas. Os valores representam a média dos 4 replicados \pm desvio padrão.

Fungicida comercial (mg.g ⁻¹ solo)	Folpete adicionado (μ g.g ⁻¹ solo)	Tempo incub. (dias)	Solo A	Solo B	Solo C	Controlo
			Metalaxil degradado (μ g. g ⁻¹ solo)			
		0	7,2 \pm 0,9	7,5 \pm 0,9	7,7 \pm 1,1	7,3 \pm 1,3
2	800	42	238,9 \pm 1,2	204,6 \pm 1,2	152,8 \pm 1,5	74,6 \pm 2,5
		70	340,0 \pm 1,5	289,4 \pm 1,2	215,9 \pm 1,4	106,9 \pm 1,7
1	400	0	3,6 \pm 0,6	3,3 \pm 0,6	3,5 \pm 1,0	3,4 \pm 0,7
		42	196,7 \pm 0,3	148,6 \pm 0,5	83,9 \pm 0,8	37,0 \pm 1,8
		70	234,7 \pm 0,6	195,6 \pm 0,7	115,9 \pm 0,8	49,9 \pm 1,2
0,5	200	0	1,7 \pm 0,4	1,8 \pm 0,3	0,8 \pm 0,3	1,2 \pm 0,2
		42	112,3 \pm 0,3	86,4 \pm 0,3	54,5 \pm 0,2	19,3 \pm 0,3
		70	142,1 \pm 0,2	116,2 \pm 0,3	77,2 \pm 0,4	26,1 \pm 0,5

Como se pode observar na **figura 2.6**, à semelhança dos resultados obtidos para o metalaxil (**Figura 2.5**), obteve-se uma relação linear ($r^2 > 0,995$) entre a percentagem de degradação do folpete e o tempo até aos 42 dias de incubação para os três solos e para as três concentrações em estudo. No entanto, a partir dos 42 dias de incubação observou-se uma diminuição gradual da degradação até aos 70 dias.

Para a concentração de fungicida comercial de 2 mg.g⁻¹ solo (**tabela 2.7** e **gráfico 1 da figura 2.6**), a percentagem de folpete degradado aos 42 dias de incubação foi de 30% (239 μ g) para o solo A, de 26% (205 μ g) para o solo B e de 19% (153 μ g) para o solo C.

O controlo (média dos valores obtidos nas amostras de solo autoclavado) apresentou um valor médio de 9% de degradação (75 µg) aos 42 dias de incubação. Aos 70 dias (final do ensaio), para a mesma concentração de fungicida comercial, a percentagem de folpete degradado foi de 43% (340 µg) para o solo A, 36% (289 µg) para o solo B, 27% (216 µg) para o solo C e de 13% para o controlo.

Para a concentração de fungicida comercial de 1 mg.g⁻¹ solo (**tabela 2.7 e gráfico 2 da figura 2.6**), aos 42 dias de incubação, a percentagem de folpete degradado foi de 49% (197 µg) para o solo A, de 37% (149 µg) para o solo B, de 22% (84 µg) para o solo C e de 10% (37 µg) para o controlo. Aos 70 dias, a percentagem de folpete degradado foi de 59% (235 µg) para o solo A, 49% (196 µg) para o solo B, de 30% (116 µg) para o solo C e de 13% (50 µg) para as amostras de solo sem população residente (controlo).

Para a concentração de fungicida comercial de 0,5 mg.g⁻¹ solo (**tabela 2.7 e gráfico 3 da figura 2.6**), aos 42 dias de incubação, a percentagem de degradação observada para nos solos com cultura de vinha A e B foi respectivamente de 56% (112 µg) e de 43% (86 µg) e para o solo sem exposição prévia ao fungicida foi de 27% (55 µg) e de 10% (19 µg) para o controlo. Aos 70 dias, a percentagem de folpete degradado foi de 71% (142 µg) para o solo A, 58% (116 µg) para o solo B, de 39% (77 µg) para o solo C e de 13% (26 µg) para as amostras de solo sem população residente (controlo).

As taxas de degradação foram calculadas para este período linear (0 - 42 dias) e estão representadas na **tabela 2.8**, expressas em µg de fungicida degradado por dia por grama de peso seco de solo.

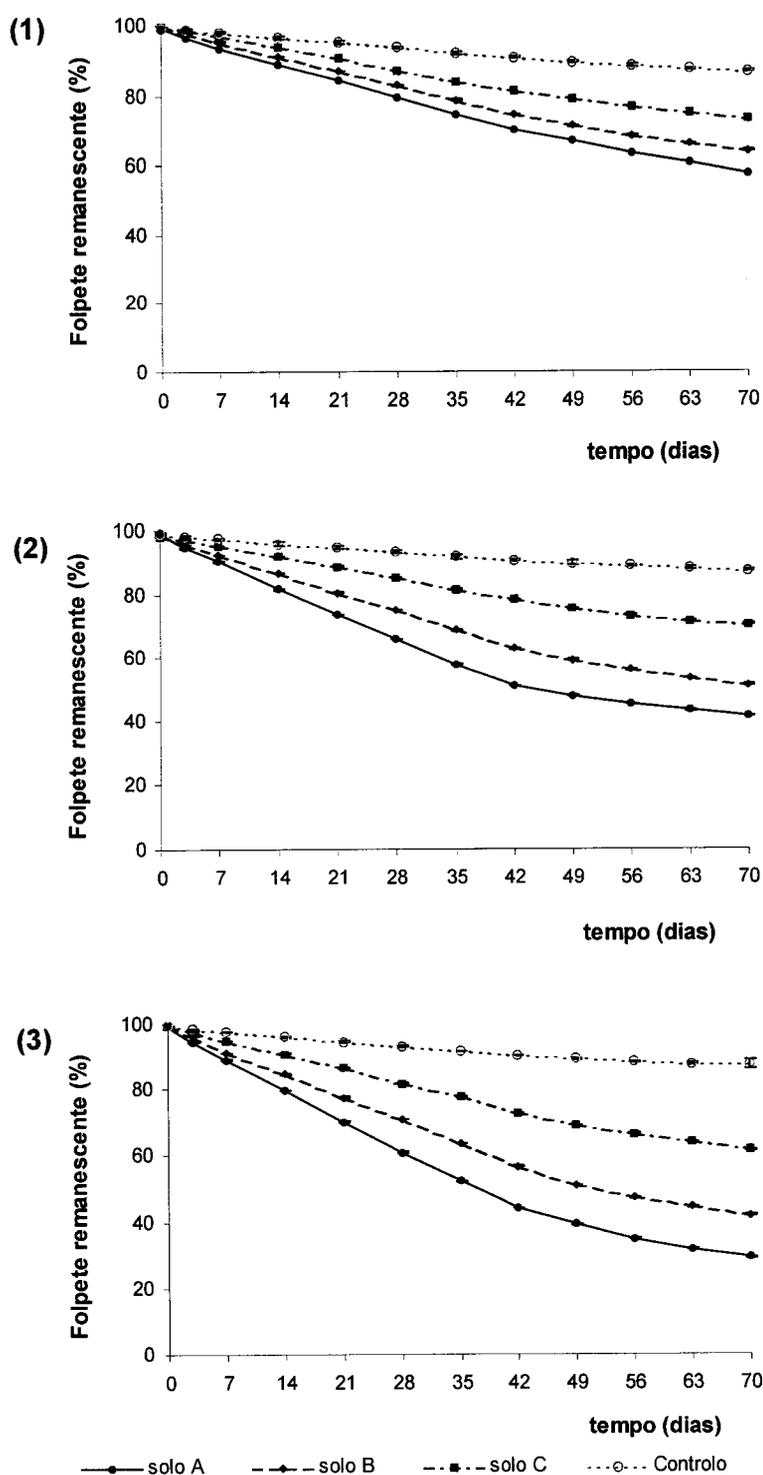


Figura 2.6 – Degradação do folpete nos solos em estudo com diferentes concentrações de fungicida comercial aplicadas: (1) 2 mg.g⁻¹ solo; (2) 1 mg.g⁻¹ solo; (3) 0,5 mg.g⁻¹ solo. Os valores representam a média de 4 replicados.

A análise de variância (**Anexo IV_A**) dos resultados obtidos nas amostras de solo em estudo mostrou que a variação da taxa de degradação do folpete em função da concentração foi significativa ($p < 0,001$) e, que, para cada uma das concentrações, houve uma variação significativa da degradação do folpete com o tipo de amostra de solo ($p < 0,01$) (tabela IV.6). Os testes de comparação múltipla de médias, efectuados pelo teste de Tukey mostraram que as médias foram significativamente diferentes em cada um dos três solos em estudo (tabela IV.7) e para cada uma das concentrações estudadas (tabela IV.8).

Tabela 2.8 - Taxas de degradação expressas em μg de folpete por grama de solo por dia. Os valores representam a média dos 4 replicados \pm desvio padrão.

Fungicida ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ solo)	Folpete ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ solo)	Solo A	Solo B	Solo C	Controlo
		(μg folpete \cdot g^{-1} solo \cdot dia^{-1})			
2	800	$5,341 \pm 0,001$	$4,750 \pm 0,003$	$3,610 \pm 0,003$	$1,633 \pm 0,005$
1	400	$4,500 \pm 0,002$	$3,371 \pm 0,001$	$1,959 \pm 0,002$	$0,801 \pm 0,010$
0,5	200	$2,588 \pm 0,001$	$1,983 \pm 0,006$	$1,272 \pm 0,002$	$0,418 \pm 0,002$

Pela análise dos resultados obtidos, observou-se que a degradação do folpete também foi superior nos solos com cultura de vinha que já tinham sido submetidas a tratamento prévio com a formulação comercial que contém este fungicida (**solos A e B**) do que no solo que não tinha sido submetido a exposições com o fungicida, e que o solo que apresentou maior degradação foi o solo cujas culturas já tinham sido submetidas a um maior número de tratamentos com o referido fungicida (**solo A**).

A análise de variância (**Anexo IV-A**) da taxa de degradação do folpete nos solos esterilizados em autoclave (controlos), à semelhança dos resultados obtidos para o metalaxil, mostrou que a variação da degradação foi significativa entre as três concentrações estudadas ($p < 0,01$) (tabela IV.9 e IV.10). No entanto, para cada uma das concentrações, a degradação do folpete nos solos sem população residente foi independente do tipo de amostra de solo em estudo (A, B ou C), pelo que a diferença obtida para o tipo de amostra de solo não foi significativa ($p = 0,38$) (tabela IV.9).

2.3.4. Estudo do tipo de microrganismos (bactérias ou fungos) que mais contribuiu para o processo de degradação dos fungicidas metalaxil e folpete nas amostras de solo

Este estudo foi efectuado a partir de amostras do solo que tinha sido, anteriormente, submetido a um maior número de exposições com o fungicida (solo A) por este ter apresentado maior capacidade para degradar os fungicidas metalaxil e folpete. Realizou-se este estudo com o objectivo de avaliar qual o grupo da população microbiana do solo (fungos ou bactérias) que actuou mais activamente na utilização do fungicida como substrato respiratório, o que nos poderá levar a extrapolar que sejam mais activos no processo de degradação destes compostos. Desta forma, adicionando diferentes compostos antimicrobianos específicos, quer para bactérias (cloranfenicol), quer para fungos (cicloheximida) e detectando a evolução do consumo de O_2 e produção de CO_2 , pretendeu-se observar qual a população microbiana esteve mais activa na presença do fungicida comercial contendo metalaxil (10% p/p) e folpete (40% p/p).

Num estudo prévio, para estabelecer as condições experimentais, utilizou-se a glucose como fonte adicional de carbono, uma vez que esta é facilmente assimilável, para observar a resposta geral do ensaio, isto é observar se o sistema responde à adição dos compostos anti-microbianos.

Os resultados obtidos após determinação das taxas de consumo de O₂ e de produção de CO₂ e os valores das contagens das populações bacteriana e fúngica estão resumidos na **figura 2.7**.

As taxas de consumo de oxigénio, após a adição de glucose em amostras do solo em estudo, foram de 0,10 mmol.dia⁻¹ no ensaio em que apenas se adicionou glucose e diminuíram para 0,05 mmol.dia⁻¹ na presença de cloranfenicol ou para 0,06 mmol.dia⁻¹ na presença de cicloheximida. No entanto, após a adição da mistura dos dois antibióticos, a taxa de consumo de oxigénio apenas diminuiu para 0,07 mmol.dia⁻¹. A variação da taxa de produção de CO₂ observada foi semelhante à descrita para a taxa de consumo de O₂, tendo diminuído na presença dos antibióticos.

O número de bactérias diminuiu de 1,7x10⁸ para 3x10⁷ ufc.mL⁻¹ na presença de cloranfenicol e o número de fungos diminuiu de 3,1x10⁸ ufc.mL⁻¹ para 2x10⁷ ufc.mL⁻¹ na presença de cicloheximida. No entanto, quando se adicionaram os dois antibióticos, em simultâneo, a população bacteriana apenas diminuiu para 1,1x10⁸ ufc.mL⁻¹ e a população fúngica para 2,4x10⁷ ufc.mL⁻¹.

Como os resultados obtidos utilizando glucose como fonte de carbono foram coerentes, procedeu-se aos estudos em solos aos quais foi adicionado o fungicida comercial que contém metalaxil (10% p/p) e folpete (40% p/p) como substrato respiratório.

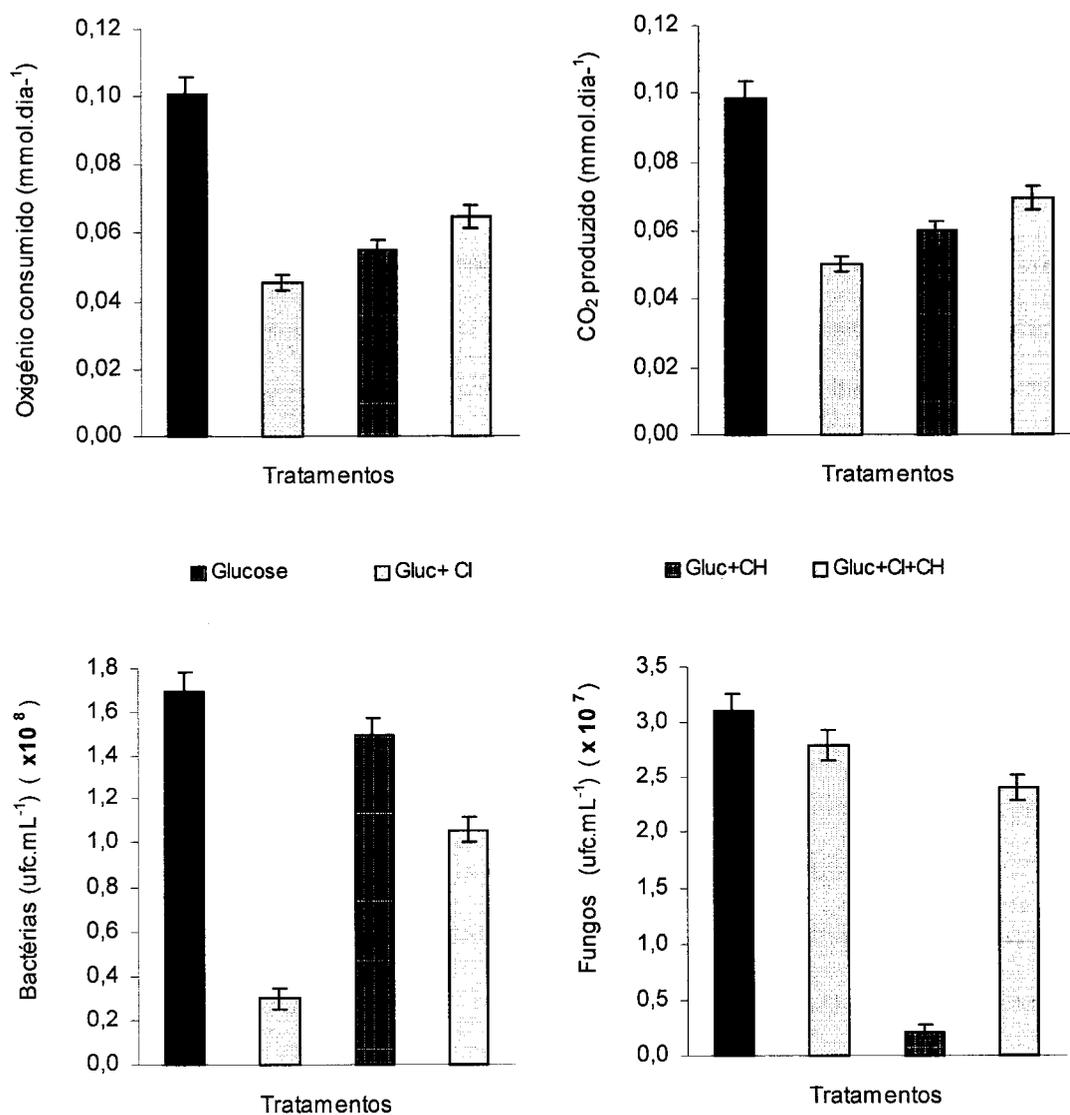


Figura 2.7– Valores das taxas de consumo de O₂ e produção de CO₂ (mmol.dia⁻¹) e do número de microrganismos isolados em TSA e CRB (ufc.mL⁻¹) quando se utilizou glucose como fonte adicional de carbono. Os resultados representam a média de 3 replicados ± o desvio padrão. (Gluc –glucose; Cl –cloranfenicol; CH – cicloheximida).

Com o objectivo de avaliar qual a concentração de fungicida mais adequada para o estudo posterior, efectuou-se um estudo comparativo do comportamento dos microbiota numa suspensão de solo sem fungicida e em três suspensões às quais foram adicionadas diferentes concentrações de fungicida comercial. Os resultados obtidos estão resumidos na **figura 2.8**.

As taxas de consumo de O₂ e de produção de CO₂ no controlo (solo sem fungicida) foram de 0,007 e de 0,010 mmol.dia⁻¹, respectivamente. A presença de fungicida comercial na concentração de 0,25 g.L⁻¹ levou a um aumento das respectivas taxas para 0,030 e 0,031 mmol.dia⁻¹. No entanto, para concentrações superiores desse fungicida observou-se uma diminuição das taxas de consumo de O₂ e de produção de CO₂ para 0,019 e 0,022 mmol.dia⁻¹, respectivamente, na presença de 0,5 g.L⁻¹ de fungicida e de 0,010 e de 0,012 mmol.dia⁻¹ na presença de 1 g.L⁻¹ deste produto comercial.

A população bacteriana aumentou de 3x10⁷ ufc.mL⁻¹ (controlo) para 6x10⁷ ufc.mL⁻¹ na presença do fungicida comercial na concentração de 0,25mg.ml⁻¹ mas diminuiu na presença de concentrações superiores deste fungicida tendo apresentado um valor de 9x10⁶ ufc.mL⁻¹ na presença de 1 mg.mL⁻¹ deste fungicida. A população fúngica observada foi superior no controlo (1,2x10⁷ ufc.mL⁻¹) do que na amostra com 0,25 mg.mL⁻¹ de fungicida comercial (1,0x10⁷ ufc.mL⁻¹) e diminuiu, proporcionalmente à concentração de fungicida utilizado, até 5x10⁶ ufc.mL⁻¹.

No **estudo para avaliação do tipo de microbiota** (fungos ou bactérias) que intervém mais activamente na utilização do fungicida como substrato respiratório, os ensaios foram efectuados na presença de uma concentração de fungicida comercial não inibitória (0,25 mg.mL⁻¹) na presença de cloranfenicol e /ou cicloheximida.

Os resultados obtidos no estudo em que se utilizou o fungicida comercial na concentração de 0,25 mg.mL⁻¹ estão apresentados nos gráficos da **figura 2.9**.

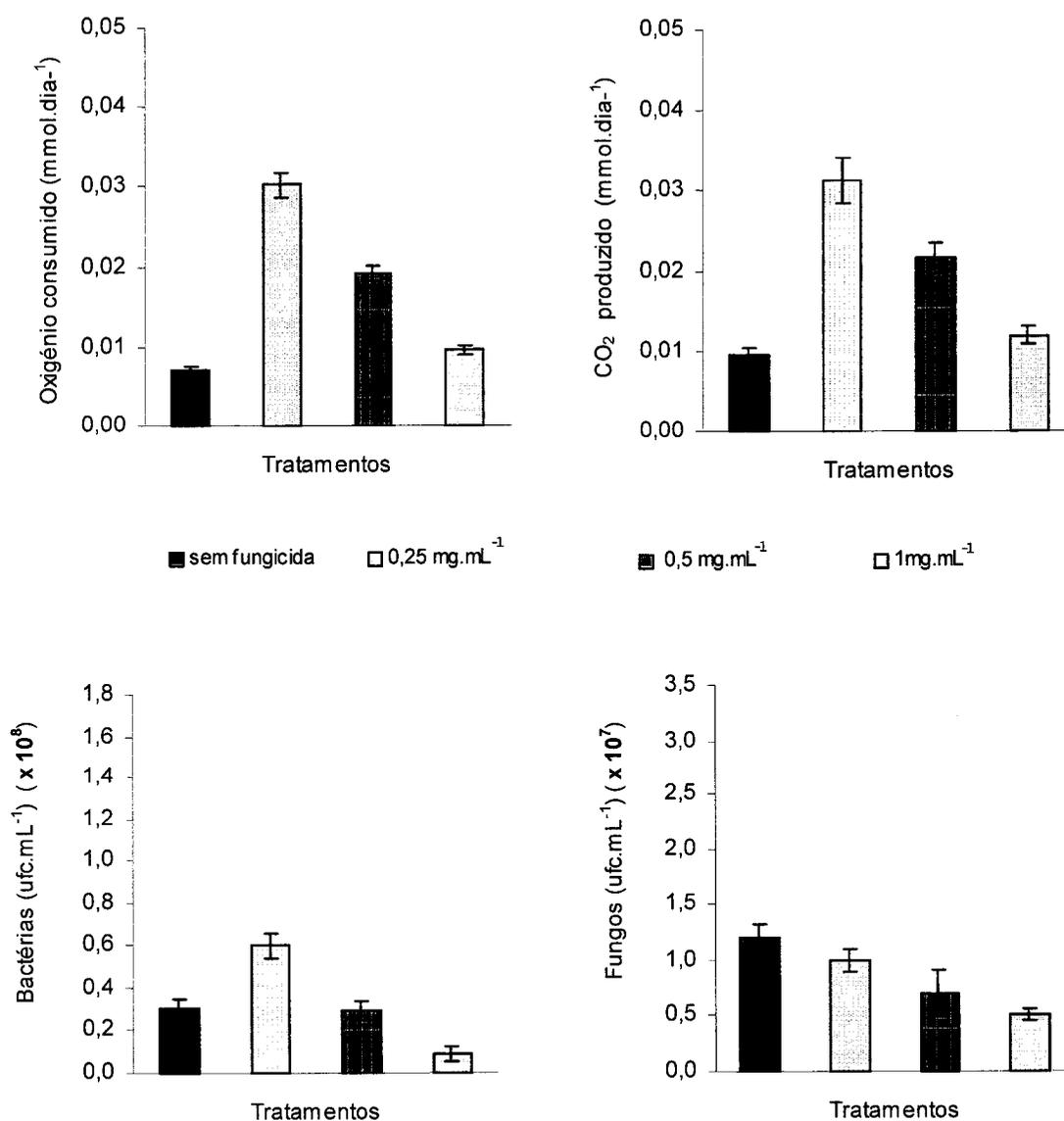


Figura 2.8 – Valores das taxas de consumo de O₂ e produção de CO₂ (mmol.dia⁻¹) e do número de microrganismos isolados em TSA e CRB (ufc.mL⁻¹) quando se utilizou fungicida comercial contendo metalaxil e folpete como fonte adicional de carbono nas concentrações indicadas. Os valores correspondem à média de 3 replicados ± o desvio padrão.

Observou-se uma diminuição das taxas de consumo de O₂ e de produção de CO₂, respectivamente de 0,030 e 0,031 mmol.dia⁻¹ para valores de 0,140 e 0,160 mmol.dia⁻¹ na presença de cloranfenicol. A presença de cicloheximida também causou uma diminuição das taxas respiratórias para valores de 0,160 e 0,180 mmol⁻¹, respectivamente.

À semelhança dos resultados obtidos na presença de glucose, também nos ensaios realizados em presença de fungicida, se observou uma diminuição inferior das taxas respiratórias na presença simultânea dos dois antibióticos relativamente às taxas obtidas para cada um dos antibióticos isolados. Nos resultados das contagens dos microrganismos observou-se que, na presença de cloranfenicol foram as estirpes fúngicas as principais responsáveis pela oxidação do fungicida enquanto que na presença de cicloheximida a metabolização do fungicida foi essencialmente devida às bactérias. Para avaliar o tipo de metabolismo, calcularam-se os valores dos coeficientes respiratórios (QR) para cada um dos ensaios. Os resultados são apresentados na **tabela 2.9**. Na presença da glucose, os valores dos coeficientes respiratórios foram, como era esperado, muito próximos de 1 e foram superiores a este valor na presença do fungicida em estudo.

Tabela 2.9 – Valores dos coeficientes respiratórios (QR) obtidos dividindo a taxa de produção de CO₂ pela taxa de consumo de O₂ para os respectivos ensaios.

Glucose	Gluc + Cl	Gluc + CH	Gluc + Cl + CH
0,98	1,11	1,09	1,07
Sem fungicida	0,25 mg.mL ⁻¹	0,5 mg.mL ⁻¹	1mg.mL ⁻¹
1,33	1,04	1,13	1,25
Fungicida (0,25 mg.mL ⁻¹)	Fung + Cl	Fung + CH	Fung + Cl + CH
1,13	1,04	1,13	1,13

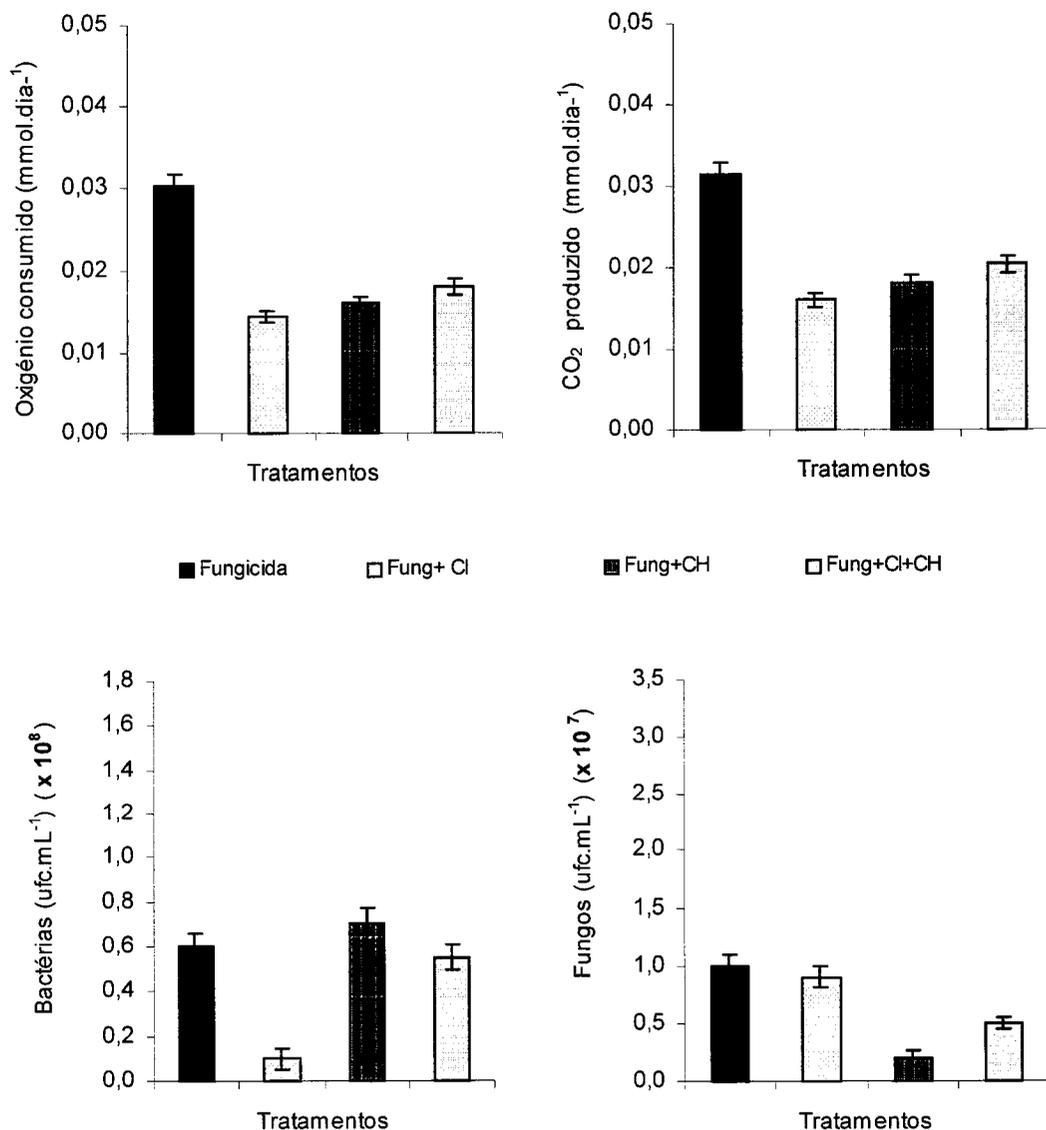


Figura 2.9 – Valores das taxas de consumo de O₂ e produção de CO₂ (mmol.dia⁻¹) e do número de microrganismos isolados em TSA e CRB (u.f.c. mL⁻¹) quando se utilizou o fungicida na concentração de 0,25 mg.mL⁻¹. Os valores correspondem à média de 3 replicados ± o desvio padrão. (Fung. – fungicida comercial; Cl – cloranfenicol; CH – cicloheximida).

2.4. DISCUSSÃO

Como já referiu anteriormente, são vários os factores que poderão influenciar a degradação dos fungicidas no solo, nomeadamente, o tipo de solo, as suas características físico-químicas e as condições ambientais. A composição do solo pode influenciar não só os processos de retenção dos fungicidas às partículas minerais e a mobilidade como também condicionar a proliferação dos microrganismos e as actividades microbianas (Somerville, 1987; Mitchell, 1993; Schiavon & Morel, 1995).

A biodegradação dos fungicidas depende assim da interligação entre os factores físico-químicos e os factores microbiológicos de um solo, uma vez que, os conteúdos em matéria orgânica e constituintes minerais influenciam a capacidade de retenção dos fungicidas no solo ou nos sedimentos e, conseqüentemente, condicionam a biodisponibilidade dos fungicidas para os processos de biodegradação (Tortensson, 1987; Novack *et al.*, 1995). Assim, como as características físico-químicas do solo também podem influenciar o processo de biodegradação, um dos estudos efectuado foi proceder à avaliação da capacidade de biodegradação de três solos pertencentes ao mesmo tipo, segundo a classificação dos Solos de Portugal, mas que diferiam no historial de aplicação dos fungicidas em estudo. Escolheram-se solos do tipo mediterrânico por serem dos mais abundantes no Alentejo e utilizados frequentemente na cultura da vinha, onde estes fungicidas são mais frequentemente aplicados (Cardoso, 1965; Júlio, 2001).

Os solos em estudo apresentaram o mesmo tipo de textura (franco-argiloso), valores de pH próximos da neutralidade, altos teores de matéria orgânica e valores semelhantes para a capacidade de troca catiónica, pelo que, foram considerados semelhantes do ponto de vista físico-químico. As pequenas diferenças observadas poderão ter sido devidas à prática de diferentes culturas, como acontece com os solos A

e B (cultura de vinha) relativamente ao solo C (cereais) ou à data em que os solos foram submetidos a tratamentos com fertilizantes.

Os valores obtidos no estudo microbiológico, para as populações bacterianas e fúngicas por grama de solo (peso seco) estão de acordo com os referidos na literatura. O número de bactérias por grama de solo varia, geralmente, entre 10^6 e 10^9 e, apesar do número de bactérias ser cerca de 100 vezes superior ao dos fungos por grama de solo, a biomassa bacteriana é geralmente inferior a metade da biomassa fúngica devido à elevada capacidade de expansão dos fungos filamentosos nos solos (Wood, 1995).

Nos estudos de degradação nos solos, observou-se uma diminuição das quantidades de fungicidas degradados a partir dos 42 dias de ensaio que poderá estar associada a uma diminuição da população microbiana ou à perda da capacidade metabólica dos microrganismos devido à duração do ensaio ter sido longa (70 dias), apesar dos solos terem sido incubados em condições de temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e de se ter tentado manter o teor em humidade no solo. A acumulação de metabolitos secundários e a acumulação de CO_2 inter-partículas também pode ter contribuído para uma diminuição da actividade da população microbiana. (Anderson, 1987).

A degradação do metalaxil nas amostras dos três solos sem população microbiana (submetidos previamente à esterilização em autoclave) foi muito menor do que a apresentada pelas mesmas amostras contendo a população microbiana residente, sugerindo que a degradação deste fungicida é essencialmente um processo de biodegradação como também já foi referido por Bailey & Coffey (1985).

Também no estudo de degradação do folpete se observou que nas amostras de solo previamente autoclavadas, embora uma certa quantidade de folpete tenha sido degradado, esta degradação foi bastante inferior à degradação observada nas mesmas

amostras quando estas continham a população microbiana. Assim, embora sujeito à degradação abiótica, grande parte da degradação deste fungicida também parece ter sido devida à acção de microrganismos residentes, pelo que, o processo de degradação do folpete nestes solos pareceu ser um processo predominantemente biótico associado a uma certa degradação abiótica. Não foram encontrados, na literatura trabalhos, sobre o folpete relacionados com este estudo. Os resultados obtidos nos estudos de degradação do metalaxil e do folpete, mostraram que a percentagem de metalaxil remanescente no solo ao fim de 10 semanas foi muito superior à percentagem de folpete remanescente e que a degradação abiótica do metalaxil foi muito inferior à do folpete, podendo estar correlacionados com o facto do tempo de semi-vida destes fungicidas no solo ser geralmente, superior para o metalaxil do que para o folpete (EPA, 1987, 1994, 1999a).

Os estudos do processo de degradação do metalaxil e do folpete, após aplicação de fungicida comercial nas concentrações de 0,5, 1 e 2 mg.g⁻¹ de solo, tiveram como objectivo avaliar o efeito da concentração dos fungicidas metalaxil e folpete no processo de degradação dos três solos. Nos solos em estudo, apesar das taxas de degradação do metalaxil e do folpete terem aumentado com a concentração de fungicida comercial, houve uma diminuição da percentagem de metalaxil e de folpete degradados com a concentração, parecendo indicar um certo efeito inibitório.

As taxas de degradação do metalaxil nas amostras de solo foram significativamente influenciadas pelo tipo de solo, tendo sido superiores nos solos com cultura de vinha que já tinham sido submetidas a tratamento prévio com a formulação comercial que contém este fungicida (**solos A e B**) do que no solo que não tinha sido submetido a exposições com o fungicida (**solo C**).

O solo que apresentou maior capacidade de biodegradação foi o solo cujas culturas já tinham sido submetidas a um maior número de tratamentos com o fungicida em estudo

(solo A), sugerindo que a população microbiana com capacidade para biodegradar estes fungicidas foi superior nestes solos. Contudo, o solo sem exposição prévia (solo C) foi o solo que apresentou um número mais elevado de população microbiana, quer bactérias, quer fungos, o que pode estar relacionado com uma possível selecção da população microbiana competente para degradar os fungicidas à medida que aumenta o número de tratamentos com o fungicida.

Por outro lado, para cada tipo de amostra de solo (A, B e C), os controlos (solos sem população microbiana), ao contrário das amostras com população residente, não apresentaram diferenças significativas nas taxas de degradação do metalaxil e do folpete, para cada uma das concentrações estudadas ($p=0,782$ e $p=0,380$, respectivamente), indicando que o processo de degradação destes fungicidas nos solos foi, essencialmente, um processo de biodegradação.

Alguns autores referem que determinadas populações de microrganismos do solo têm capacidade para degradar e para se adaptar podendo utilizar uma enorme variedade de compostos orgânicos (Racke, 1990 a, b; Hart & Brokes, 1992; Chaîneau *et al.*, 1999) incluindo herbicidas (Roeth *et al.*, 1990; Smith & Lafond, 1990) e fungicidas (Aharonson *et al.*, 1990; Walker & Welch, 1990).

Segundo alguns estudos, a biodegradação de um determinado pesticida nos solos pode ser facilitada pelo número de tratamentos do solo e pelo pH do solo, sendo, geralmente, superior nos solos com valores de pH mais elevados e após a adição repetida desse composto ou similar, aumentando proporcionalmente com o número de aplicações (Somerville, 1987; Racke, 1990 a,b; Warton & Matthiessen, 2000).

O fenómeno da biodegradação facilitada em solos com aplicações repetidas de um dado fungicida ou similar também já foi referido para o metalaxil (Bailey & Coffey, 1985, 1986). Nesses estudos os autores referem que houve um aumento da capacidade de

biodegradação do metalaxil em solos com cultura de abacate com um historial de aplicação de 2 - 5 anos de tratamento com esse fungicida relativamente a solos idênticos sem aplicações anteriores do fungicida. No entanto, segundo alguns estudos, nem sempre a aplicação repetida de metalaxil conduz a um aumento das taxas de biodegradação deste fungicida no solos, sendo a biodegradação também influenciada pelo tipo de solo e pelas suas características físico-químicas e biológicas (Papini & Andrea, 2000, 2001). Para estes autores, para além da aplicação repetida de fungicidas nos solos, a acidez e o elevado conteúdo em matéria orgânica dos solos são condições mais favoráveis para, após aplicação repetida de metalaxil, facilitar o desenvolvimento de microrganismos que o possam utilizar como única fonte de carbono e assim aumentar a capacidade de biodegradação.

No presente estudo, as semelhanças dos solos no que respeita às suas características físico-químicas, as diferenças observadas na flora microbiana e o facto dos três solos, na ausência de população residente (controlos), terem apresentado a mesma capacidade para degradar os fungicidas metalaxil e folpete, parecem indicar que o processo de degradação destes fungicidas nos solos foi, essencialmente, um processo de biodegradação e que esse processo pode estar associado a uma especialização e diversidade da população microbiana residente.

As diferenças observadas nas taxas de degradação poderão ser atribuídas à variabilidade da população microbiana (quer em quantidade quer em diversidade) que intervêm na degradação do metalaxil e do folpete, sugerindo uma especialização desta população à medida que aumenta o número de tratamentos. Este factores poderão estar relacionados com a biodegradação facilitada observada nos solos com cultura de vinha (solos A e B), nos quais poderá ter havido o desenvolvimento de microflora apta para degradar os fungicidas em estudo.

O metabolismo das comunidades microbianas em substratos complexos, como acontece com o solo, pode ser avaliado pela quantificação do metabolismo respiratório através da determinação das taxas de oxigénio consumido e/ou de CO₂ produzido. O estudo prévio com glucose, utilizado para estabelecer as condições ambientais, mostrou que a adição de antibióticos ao solo levou a uma diminuição da população bacteriana (adição de cloranfenicol) ou fúngica (adição de cicloheximida) com diminuição das taxas de consumo de O₂ e de produção de CO₂ embora se tenha observado uma diminuição da actividade dos antibióticos quando estão em presença um do outro. O aumento das taxas de consumo de O₂ e de produção de CO₂ nos solos que continham o fungicida comercial relativamente ao controlo (solo sem fungicida) sugere que os microrganismos sobreviventes poderão utilizar o fungicida como principal fonte de carbono. No entanto, para concentrações mais elevadas de fungicida observou-se um certo efeito inibitório com diminuição das taxas respiratórias e do número de microrganismos no solo.

O estudo do efeito da adição de antibióticos a suspensões de solos contendo os fungicidas metalaxil e folpete foi efectuado com o objectivo de avaliar qual o tipo de microrganismos (bactérias ou fungos) que intervém mais activamente no processo de degradação destes fungicidas no solo. Os resultados indicaram que a adição de antibióticos não reduz completamente a respiração do microrganismo no solo tendo-se observado que a utilização do fungicida comercial contendo metalaxil e folpete pelos microrganismos, à semelhança do que acontece para a glucose, continuou a ser um processo essencialmente oxidativo ($Q \approx 1$), embora a taxa de consumo de oxigénio tenha sido inferior na presença dos antibióticos em estudo. Para concentrações baixas de fungicida comercial, o metalaxil e o folpete foram oxidados pelos microrganismos do solo, parecendo que quer as bactérias quer os fungos intervieram no processo de biodegradação e que na presença de um composto anti-bacteriano os fungos conseguiram manter esse processo de biodegradação e vice-versa. O metabolismo dos

fungicidas pela população residente foi um processo essencialmente oxidativo no qual quer as bactérias quer os fungos responderam positivamente à presença dos fungicidas em estudo.

Tendo presente que objectivo geral do trabalho foi seleccionar microrganismos activos para uma posterior aplicação em processos de biorremediação no solo, e sabendo que os fungos devido à sua forma de crescimento filamentoso conseguem proliferar numa área do solo muito maior do que as bactérias, os ensaios descritos no capítulo seguinte desta dissertação serão realizados com o objectivo de seleccionar fungos activos para biodegradar o metalaxil e o folpete.

Os fungos quando aptos para degradar um fungicida são mais eficazes para essa degradação no solo do que as bactérias, o que está relacionado com o seu modo de crescimento (Novack *et al.*, 1995). Em contraste com as bactérias, as quais formam pequenos agregados ou biofilmes que ocupam um pequeno volume de solo, os fungos filamentosos têm longas hifas que podem proliferar pelo solo e atingir os diferentes microhabitats. Os fungos produzem micélios filamentosos compostos por hifas individuais que se adaptam ao tamanho e às formas irregulares das partículas do solo, conferindo-lhes capacidade de expansão, podendo abranger uma área bastante elevada do solo (Wood, 1995). Além disso, os fungos têm ainda capacidade para segregar uma quantidade significativa de enzimas e degradar os compostos, absorver as subunidades degradadas e translocá-las através das suas hifas (Coleman & Crossley, 1996). Por outro lado, de uma maneira geral, existe sempre uma maior proporção de biomassa fúngica por grama de solo (Wood, 1995). Por estas razões, os fungos são os principais intervenientes no processo de transformação da matéria orgânica do solo incluindo a transformação de muitos pesticidas, pelo que o estudo desta população poderá ser importante, especialmente se forem detectadas estirpes que intervenham no processo de oxidação dos fungicidas em estudo (Alexander, 1994; Glaser & Lamar, 1995; Bending *et al.*, 2002).

Por tudo o que foi exposto, como a biomassa fúngica apresentou variabilidade ao nível da espécie nos três solos, em particular nos solos com exposição prévia aos fungicidas (solos A e B) relativamente ao solo onde estes nunca tinham sido aplicados (solo C) e, ainda, porque o solo que tinha sido submetido a um maior número de tratamentos (solo A) foi o que apresentou maior capacidade de biodegradação, os estudos irão prosseguir com o objectivo de seleccionar, a partir da **população fúngica** isolada no **solo A**, estirpes com capacidade para degradar o metalaxil e do folpete nos solos.

CAPÍTULO 3

Seleção, identificação e caracterização molecular de fungos com capacidade para degradar os fungicidas metalaxil e folpete

3.1. INTRODUÇÃO

3.1.1. Seleção de fungos tolerantes ao metalaxil e ao folpete

A aplicação da biotecnologia às técnicas de biorremediação do solo tem levado, nos últimos anos, à pesquisa de microrganismos com capacidade para mineralizar ou transformar os poluentes em compostos menos tóxicos (Bollag & Bollag, 1995; Lenhard *et al.*, 1995).

Para a seleção de estirpes microbianas com determinadas características fisiológicas e bioquímicas, recorre-se frequentemente à técnica de enriquecimento

selectivo. Nesta técnica, determinam-se as condições selectivas para a obtenção de um ambiente controlado que favoreça a predominância de algumas estirpes microbianas relativamente a outras presentes no inóculo inicial, permitindo o seu isolamento de uma forma reprodutível e relativamente simples (Pereira, 1996; Siddique *et al.*, 2003).

Quando se procede à selecção de microrganismos com capacidade para utilizar um determinado composto químico pela técnica de enriquecimento selectivo, prepara-se um inóculo misto, em geral, obtido a partir de amostras colhidas em locais onde se detecta a presença desse composto, de forma a que esses microrganismos já tenham estado em presença do composto (Pereira, 1996). Posteriormente, procede-se à incubação desse inóculo, em condições previamente definidas, num meio selectivo em que esse composto é fornecido como substrato limitante e como única fonte de um nutriente essencial ou ao qual são adicionados antibióticos ou impostas outras condições restritivas (Wayman & Parekh, 1990; Egli, 1992; Siddique *et al.*, 2003). Após alguns dias de incubação, uma pequena quantidade de cultura isolada é transferida ou subcultivada num meio idêntico e o processo repete-se até obtenção da estirpe pretendida (Wayman & Parekh, 1990).

Quando os compostos a utilizar podem ser tóxicos para os microrganismos, como acontece com os fungicidas e outros xenobióticos, por vezes, as quantidades toleradas pelos microrganismos são relativamente baixas e nem sempre é possível utilizar esse xenobiótico como nutriente limitante. Neste caso, procede-se, geralmente, à adição do composto em quantidades crescentes mas não como nutriente limitante (Pereira, 1996).

Em geral, o enriquecimento selectivo é efectuado em sistemas fechados tais como as culturas em "batch", em frascos contendo meios de cultura líquidos, onde a concentração dos nutrientes e dos seus produtos de metabolização variam continuamente durante o crescimento do microrganismo.

O enriquecimento efectua-se através de sucessivas transferências do inóculo para meios de cultura frescos, resultando no acréscimo dos microrganismos capazes de se multiplicarem utilizando o composto em estudo ou de, pelo menos, crescerem em presença de determinadas concentrações desse composto (Wayman & Parekh, 1990; Egli, 1992).

Como já referimos, alguns estudos indicam que solos previamente submetidos a vários tratamentos com determinados pesticidas possuem maior capacidade para degradar esses compostos ou similares e que alguns microrganismos conseguem tolerar concentrações elevadas de um determinado pesticida e, simultaneamente, contribuem para a sua degradação (Racke, 1990a; Martin *et al.*, 1995, 1999).

Neste contexto, procedeu-se à seleção de microrganismos isolados a partir de amostras de um solo cuja população microbiana apresentou maior capacidade para degradar os fungicidas em estudo.

Optou-se por seleccionar estirpes fúngicas porque estas conseguem proliferar facilmente e abranger uma área muito maior no solo do que as bactérias, pelo que, quando apresentam capacidade para degradar um fungicida são mais eficazes nos processos de biorremediação em solos contaminados (Novack *et al.*, 1995).

Neste trabalho, a técnica de isolamento selectivo foi utilizada com o objectivo de seleccionar uma ou mais estirpes fúngicas com capacidade para tolerar e degradar concentrações de metalaxil e folpete relativamente altas.

O fenómeno de resistência aos fungicidas poderá estar associada à capacidade dessas estirpes para reduzir o tempo de meia-vida destes compostos, quer devido a processos bioquímicos de eliminação biológica do fungicida (como a biotransformação

em compostos menos tóxicos e mais facilmente metabolizáveis) quer à utilização destes compostos como fonte de carbono e energia.

A estratégia que se seguiu envolveu três etapas principais:

- ✓ preparação de um inóculo misto com os fungos isolados a partir de amostras do solo que apresentou maior capacidade de degradação para os fungicidas metalaxil e folpete;
- ✓ enriquecimento selectivo em meio líquido ao qual se adicionaram concentrações crescentes do fungicida comercial que contém metalaxil e folpete;
- ✓ selecção das estirpes mais resistentes aos fungicidas, com base nos valores de tolerância obtidos, para servirem de material biológico a utilizar nas restantes partes experimentais desta dissertação.

3.1.2. Métodos moleculares para a caracterização de estirpes fúngicas

As tecnologias de análise molecular da variabilidade do DNA permitem determinar zonas de referência no genoma, denominadas marcadores moleculares. A utilização de marcadores moleculares para diferenciação das espécies permite abordagens alternativas à caracterização morfológica das espécies fúngicas.

Entre as técnicas mais simples de análise da variabilidade genética que não exigem um conhecimento detalhado do genoma, podem distinguir-se a análise de polimorfismos em produtos de amplificação por PCR denominada por **RAPD** (Random Amplified Polymorphic DNA) (Williams *et al.*, 1990; Welsh & McClelland, 1990) e a amplificação por

PCR de sequências satélites que permite a determinação de perfis de bandas que reflectem o polimorfismo existente nestas regiões de DNA repetido, denominada por **MSP-PCR** (Microsatellite-Primed - PCR) ou **RAMP** (Random Amplified Microsatellite Polimorphisms) (Weising *et al.*, 1995; Caetano-Anollés & Gresshoff, 1997; Martin *et al.*, 1998).

A técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) é normalmente utilizada para amplificar uma região conhecida de DNA utilizando dois “primers” que flanqueiam a região a detectar (Erlich, 1989). Nas técnicas de RAPD e de MSP-PCR, utiliza-se apenas um “primer” na reacção de PCR para amplificação de fragmentos de DNA em locais específicos do genoma, observando-se, para cada amostra, várias bandas após electroforese em gel. Cada conjunto destas bandas denomina-se padrão de amplificação ou “fingerprinting” e pode reflectir diferenças entre amostras de DNA, permitindo, de uma forma relativamente simples e rápida, determinar o grau de variabilidade entre espécies (Meyer *et al.*, 1991; Weising *et al.*, 1995; Caetano-Anollés & Gresshoff, 1997; Griffiths *et al.*, 2000).

As técnicas de RAPD baseiam-se na amplificação aleatória por PCR de sequências desconhecidas de DNA utilizando “primers” de sequências arbitrárias (Williams *et al.*, 1990). Esta técnica utiliza como “primers” oligonucleótidos sintéticos de pequenas dimensões (10 –15 pb) com uma percentagem elevada do par guanina - citosina. A amplificação de segmentos ocorre onde a complementaridade entre o “primer” e o local de iniciação do DNA molde é mais alta, sendo amplificados segmentos de RAPD mesmo que a homologia entre os locais de iniciação e o “primer” não seja perfeita (Griffiths *et al.*, 2000). Para além da necessidade de estudar vários “primers”, as técnicas de RAPD são muito sensíveis a variáveis experimentais devido às baixas condições de restringência e ao facto do “primer” se poder ligar a vários locais, pelo que, nem sempre se observa reprodutibilidade nos resultados obtidos (Williams *et al.*, 1990).

Nas técnicas de MSP-PCR ou RAMP utilizam-se “primers” dirigidos para sequências satélites do DNA. O termo microssatélites, também chamado sequências simples repetitivas (SSR – simple sequence repeats), designa curtas sequências de DNA que se repetem até algumas dezenas de vezes (Tautz & Renz, 1984). Conforme o número de nucleótidos que compõem a sequência repetida em tandem, podemos estar na presença de DNA microssatélite (2 a 10 nucleótidos) ou mini-satélite (15 a 30 nucleótidos) (Griffiths *et al.*, 2000). Estas sequências, somaticamente estáveis e hipervariáveis no número de repetições, encontram-se distribuídas no genoma e permitem o seu uso como marcadores moleculares.

A aplicação de “primers” dirigidos para sequências satélites em reacções de amplificação por PCR, denominada por MSP-PCR ou por RAMP, permite a determinação de perfis de bandas que reflectem o polimorfismo existente nestas regiões de DNA repetido e a distância que as separa entre si (Weising *et al.*, 1995). Para tal utiliza-se apenas um “primer” que pode hibridar em qualquer região do microssatélite. Um dos “primers” mais utilizado foi isolado do bacteriófago M13, apresenta uma sequência que já foi detectada em múltiplas cópias espalhadas no genoma humano (Wyman & White, 1980) e ao ser aplicado a outros eucariotas, como por exemplo aos fungos unicelulares e filamentosos, demonstrou ter um elevado poder de diferenciação ao nível da espécie.

Vários autores já salientaram o elevado poder identificativo desta técnica, porque permite obter perfis muito homogêneos para a mesma espécie e completamente diferentes em espécies distintas, sendo possível, definir um perfil padrão para cada espécie, obtendo-se uma impressão digital (“fingerprint”) para cada espécie (Meyer & Mitchell, 1995; Buscot *et al.*, 1995; Longato & Bonfante, 1997; Martin *et al.*, 1998).

Uma das grandes vantagens da técnica de MSP-PCR relativamente ao RAPD é a sua elevada reprodutibilidade que resulta da elevada restringência a que decorre a

reação de PCR porque o “primer” é dirigido para sequências específicas. É rápida e fácil de executar, verifica-se uma universalidade de sequências repetidas, exige quantidades mínimas de DNA molde e é bastante reprodutível.

A nível taxonómico, a técnica de MSP-PCR ou RAMP revela graus favoráveis de polimorfismo e parece ter um grande potencial na distinção de espécies e na análise da variabilidade intra-específica, sendo considerado um dos métodos mais sensíveis para a diferenciação de estirpes (Weising *et al.*, 1995; Caetano-Anollés & Gresshoff, 1997; Martin *et al.*, 1998).

Neste estudo, a técnica de MSP-PCR foi utilizada com os objectivos de :

- ✓ identificar a estirpe *Gongronella* sp. por comparação dos perfis electroforéticos obtidos para a estirpe isolada e para duas estirpes padrão (*G. butleri* e *G. lacrispora*);
- ✓ caracterizar a nível molecular as estirpes *Gongronella* sp. e *Rhizopus stolonifer* isoladas antes e após o processo de selecção para avaliar se a capacidade de adaptação destas espécies aos fungicidas teria sido ou não acompanhada de variações a nível molecular.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Microrganismos estudados

Os organismos utilizados neste estudo foram as estirpes fúngicas referidas na **tabela 2.4.**, isoladas a partir de amostras do solo que apresentaram maior capacidade de biodegradação (**solo A**), tendo em conta os resultados obtidos no **capítulo 2**.

3.2.2. Ensaio de selecção de espécies tolerantes aos fungicidas metalaxil e folpete

Estes ensaios basearam-se na inoculação de meios de cultura líquidos suplementados com o fungicida comercial, tendo-se aumentado progressivamente a sua concentração com transferência de um inóculo da cultura com uma determinada concentração de fungicida para uma cultura de concentração imediatamente superior. O esquema geral deste método encontra-se representado na **figura 3.1**.

O fungicida comercial contendo metalaxil (10 % p/p) e folpete (40 % p/p), previamente esterilizado em autoclave, foi adicionado ao meio de cultura nas quantidades necessárias para obter as concentrações pretendidas. As condições gerais dos ensaios foram as seguintes:

Meios de cultura utilizados – Malt Extract Broth (MEB) (**Anexo II - A**)

Concentrações de fungicida comercial – 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400 e 1500 mg.L⁻¹.

Condições de incubação – 180 r.p.m. a 25°C.

Para a selecção de fungos resistentes aos fungicidas em estudo, preparou-se um inóculo misto a partir das colónias de fungos filamentosos isolados do solo com maior capacidade de degradação (**solo A**) e crescidas durante 5 dias em meio MEA. As contagens foram efectuadas em câmara de Neubauer e o volume foi ajustado de forma a obter uma suspensão homogénea com 1×10^5 esporos por mL de inóculo.

Os ensaios, realizados em condições de assepsia, foram iniciados com a adição de 1 mL do inóculo misto de fungos a um balão Erlenmeyer de 250 mL contendo 24 mL de meio de MEB com uma concentração de fungicida comercial de 100 mg.L⁻¹, sendo esta a primeira concentração testada.

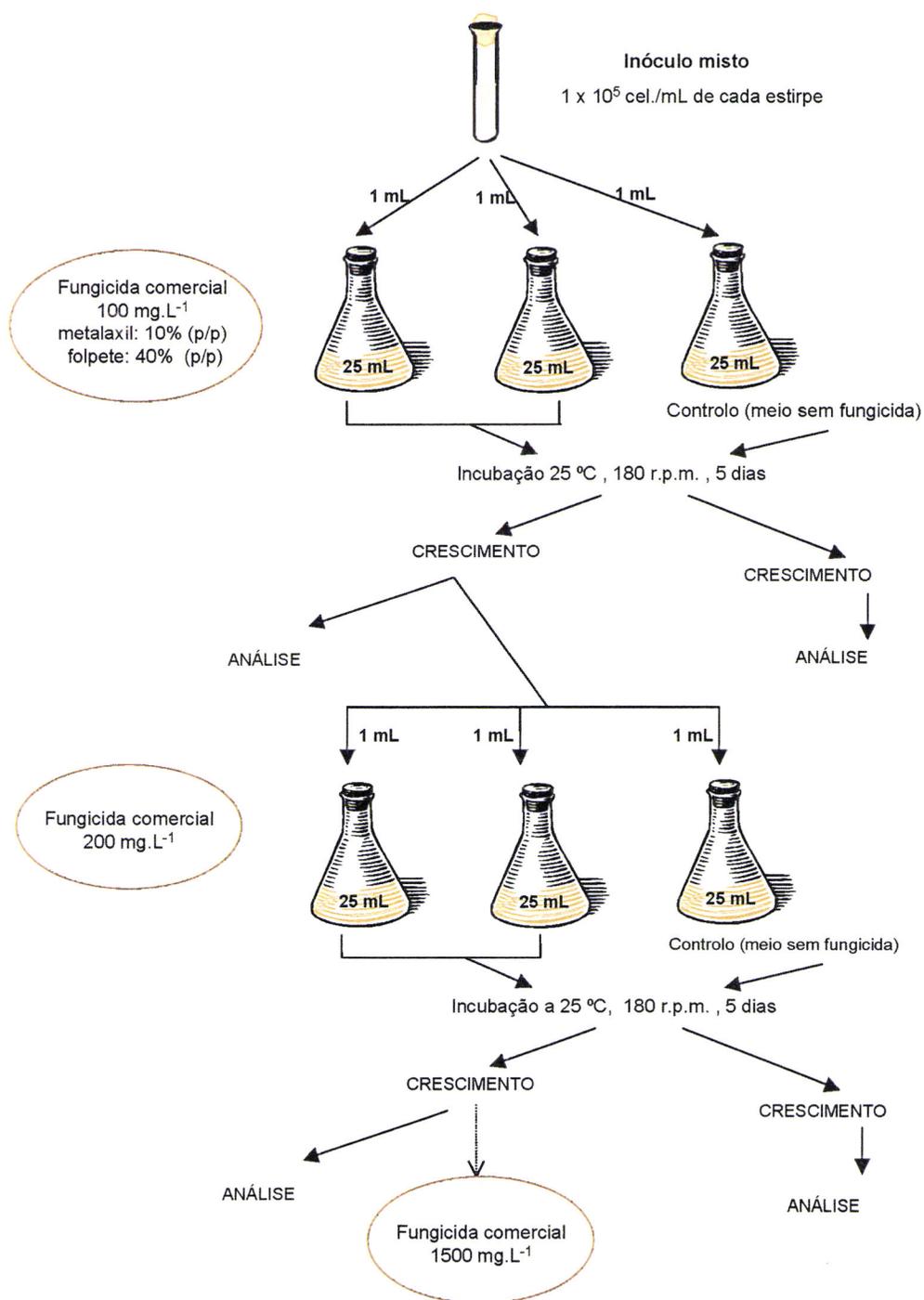


Figura 3.1 – Esquema do ensaio de selecção, em meio líquido, para obter espécies tolerantes aos fungicidas metalaxil e folpete.

Os balões Erlenmeyer foram fechados com rolhas de algodão e colocados a incubar num agitador orbital (Heidolph Unimax 2010) a 180 rpm durante 7 dias a 25°C.

Após o período adequado de crescimento, transferiu-se um inóculo de 1 mL da suspensão anterior para balões Erlenmeyer de 250 mL contendo o meio de cultura com a concentração de fungicida imediatamente superior, procedendo-se de igual forma e sequencialmente, até se atingir a concentração máxima testada como se esquematizou na **figura 3.1**.

Em todas as fases da selecção, foi efectuado um controlo sem fungicida, de forma a confirmar a detecção de todas as estirpes que sobreviveram à concentração de fungicida imediatamente anterior.

No momento de retirar o inóculo de fungos para a concentração de fungicida imediatamente superior, procedeu-se ao plaqueamento nos meios de CRB e de MEA, tendo o cuidado de realizar as necessárias diluições de forma a obter colónias isoladas, procedendo-se assim a uma análise qualitativa dos fungos que resistiram à concentração em estudo.

3.2.3. Ensaios de confirmação em meio sólido

As estirpes fúngicas com capacidade para tolerar concentrações mais elevadas do fungicida (**secções 3.3.1 e 3.3.2**), isoladas no ensaio de selecção, foram submetidas a ensaios de confirmação em meio sólido.

A capacidade de resistir a altas concentrações de pesticida foi confirmada em cultura pura, em placas de Petri contendo meio de MEA, suplementado com concentrações crescentes de pesticida comercial (0, 50, 100, 200, 400, ..., 2000 mg.L⁻¹).

Para cada concentração de fungicida e para cada microrganismo, efectuaram-se ensaios em triplicado.

O inóculo de cada estirpe fúngica foi preparado a partir de uma cultura crescida a 25°C num tubo com MEA em rampa e com 7 dias de idade. Deste tubo, foi retirada, com a ajuda de uma ansa, uma porção de micélio de uma zona bem esporulada, que se colocou num pequeno criotubo que continha 0,5 mL de uma solução estéril de agar semi-sólido (**Anexo II - A**). Depois de bem homogeneizada, uma gota desta suspensão, com a ajuda de uma ansa foi inoculada no centro de cada placa de Petri a utilizar nos ensaios de confirmação. Procedeu-se da mesma forma para todos os fungos a testar neste ensaio. As placas foram colocadas numa estufa de incubação a 25°C. Após 4 dias de incubação para o *Rhizopus stolonifer* e de 7 dias de incubação para os restantes fungos em ensaio, mediu-se o diâmetros das colónias.

3.2.4. Determinação do valor de EC₅₀ do fungicida comercial para os fungos seleccionados

A determinação da concentração mínima efectiva para a qual se verifica um crescimento igual a 50% (EC₅₀) pode ser feita através de medições em intervalos de tempo regulares após a inoculação, de forma a calcular a taxa de crescimento radial, ou então, através de uma única medição após um período de tempo específico (Ellis *et al.*, 1982; Gadd, 1986).

No presente trabalho, optámos pela medição do diâmetro da colónia após um determinado tempo de incubação, como referido na secção anterior. Para cada fungo e para cada concentração de fungicida comercial com metalaxil e folpete, foram utilizadas três placas para medir o diâmetro da colónia, de forma a obter uma média de três medições.

A percentagem de inibição do fungicida para cada fungo foi calculada utilizando a seguinte relação:

$$\% \text{ de inibição} = [(dC - dE) / dC] * 100$$

Nesta equação, **dC** representa o diâmetro médio da colónia do fungo no controlo (meio sem fungicida) e **dE** representa o diâmetro médio da colónia do fungo numa determinada concentração de fungicida.

A percentagem de inibição foi representada graficamente em função do logaritmo da concentração de fungicida comercial, de forma a obter uma relação linear, sendo calculado o valor do EC_{50} para cada fungo. Entende-se por EC_{50} a concentração efectiva de fungicida comercial para a qual se obteve 50% de inibição do crescimento da cultura de microrganismo.

3.2.5. Identificação da estirpe designada por micélio estéril 3

Como não foi possível identificar por métodos clássicos o fungo que designámos por micélio estéril 3, por este não apresentar formação de estruturas reprodutoras nos meios testados (**secção 2.2.5**) e pelo facto deste fungo ter mostrado capacidade para resistir a concentrações elevadas de fungicida houve interesse em tentar identificá-lo.

Como se tratava de um fungo isolado a partir de um solo de vinha, na tentativa de induzir a sua esporulação, efectuaram-se vários ensaios em placas de Petri contendo um meio de agar sólido (1,5% p/v), adicionando alguns constituintes vegetais, como por exemplo, pequenos fragmentos de folhas, pecíolos e pequenas frutificações de videira e grãos de milho e de trigo. Além disso, utilizaram-se também placas de Petri contendo meio de agar (1,5% p/v) com solo estéril incorporado (5 g por placa).

Com o intuito de remover os fungos que poderão existir à superfície dos vegetais, o material vegetal foi previamente esterilizado, tendo sido colocado durante 3 minutos em etanol 75% (p/v) e, em seguida, lavado com água estéril e colocado numa solução de NaClO 10% (p/v) durante 3 minutos. Posteriormente, o material foi lavado 2 a 3 vezes com água estéril.

Nos ensaios em que se utilizaram os constituintes vegetais após inoculação do micélio ao centro de cada placa de Petri, os constituintes vegetais foram colocados equidistantes e em círculo de forma a ficarem relativamente próximos do micélio. Nos ensaios com solo incorporado, o micélio foi inoculado no centro das placas de Petri.

Após inoculação do fungo, uma série de placas foi colocada a incubar em estufa a 25°C durante 7 dias. Simultaneamente, outra série de placas foi colocada à temperatura ambiente, numa prateleira do laboratório, sujeitas às oscilações diárias de temperatura e fotoperíodo, durante 10 dias. Para cada ensaio, efectuaram-se 5 réplicas. As placas foram observadas à lupa esterioscópica.

O micélio foi repicado dos locais onde se observaram esporângios para PDA e incubado à temperatura de 25°C durante 7 dias. Após incubação, o fungo foi identificado por observação microscópica das estruturas vegetativas e reprodutoras, utilizando-se chaves taxonómicas adequadas (Smith, 1969; Domsch *et al.*, 1980). A estirpe foi identificada como *Gongronella* sp.

3.2.6. Manutenção dos microrganismos isolados

As estirpes fúngicas isoladas no ensaio de selecção (**secções 3.2.2 e 3.2.3**) foram identificadas e designadas com um registo diferente. A manutenção das subculturas foi efectuada de forma idêntica à referida na **secção 2.2.6 do capítulo 2** em meios de MEA ou de PDA adicionados de fungicida comercial autoclavado na concentração de 0,1 g.L⁻¹.

3.2.7. Análise molecular da estirpe fúngica *Gongronella* sp.

Como não foi possível identificar esta estirpe ao nível da espécie por métodos clássicos, fez-se uma aplicação de métodos moleculares utilizando como critério de comparação das duas espécies descritas para o género *Gongronella*: *G. butleri* e *G. lacrispora*.

Através da técnica de MSP-PCR, também denominada RAMP, procedeu-se à comparação dos perfis electroforéticos da estirpe de *Gongronella* sp. isolada do solo (anteriormente designada por micélio estéril 3) com as estirpes padrão de *Gongronella butleri* (ATCC 8989) e *Gongronella lacrispora* (ATCC 24412).

3.2.7.1. Organismos

Os fungos filamentosos utilizados neste estudo foram as estirpes de *Gongronella* sp. isolada do solo e as estirpes padrão de *Gongronella*: *G. butleri* e *G. lacrispora*. As estirpes foram cultivadas em PDA, durante 7 dias a 25°C.

3.2.7.2. Extracção do DNA

O protocolo utilizado para o isolamento do DNA das estirpes em estudo foi adaptado a partir de dois métodos muito utilizados para extracção de DNA de fungos filamentosos: o método das microesferas (Sambrook *et al.*, 1989) e o método do tiocianato de guanidina (adaptado de Pitcher *et al.*, 1989). A lise celular foi efectuada ressuspensando as células em 0,5 mL de tampão de lise (pH 8) num tubo Eppendorf de 1,5 mL e adicionando 0,2 mL de microesferas (425 – 600 µm de diâmetro). Após agitação no vortex (Heidolph Reax 2000) à velocidade máxima durante 2 minutos, a suspensão foi colocada a 65°C durante 1 hora. Após incubação, as células foram novamente agitadas no vortex durante 2 minutos e, posteriormente, centrifugadas a 14 000 rpm durante 15 min. a 4°C.

O sobrenadante foi recolhido para outro tubo Eppendorf de 2 mL e adicionaram-se 500 μL de TE com RNase na concentração de 50 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. Os tubos Eppendorf foram incubados em banho de água a 37°C, durante 30 min e, posteriormente, foram adicionados de 500 μL da mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Após mistura das fases, por inversão, procedeu-se a nova centrifugação a 10 000 rpm, durante 10 min.

O sobrenadante foi retirado para um novo tubo Eppendorf de 2 mL e adicionado de acetato de sódio 3 M a pH 5,2 na proporção de 1/10 do volume e misturado por inversão. Adicionaram-se 2,5 volumes de etanol absoluto (-20°C) e a mistura foi homogeneizada por inversão. A mistura foi centrifugada a 13 000 r.p.m. durante 15 min, o sobrenadante foi decantado e o sedimento foi lavado com 1 mL de etanol a 70% (v/v) e centrifugado a 10 000 rpm durante 10 min. Após secagem em estufa entre 30 e 37°C, durante 5 a 10 min., o DNA foi solubilizado em 0,1 mL de tampão TE e guardado a -4°C.

3.2.7.3. Avaliação da integridade do DNA e quantificação por electroforese em gel de agarose

Para avaliar a qualidade do DNA em termos da dimensão média dos fragmentos obtidos, procedeu-se a uma electroforese em gel de agarose a 1% (p/v) em TBE 1X (**Anexo I - C**). Após aplicação do DNA extraído (5 μL de DNA diluído de 1:2 com corante 1X) e do marcador de massas molares 1 Kb (Fermentas) com a concentração de 0,5 $\text{mg}.\text{mL}^{-1}$ de DNA (1 μL diluído de 1:10 com solução de corante 1X), o gel foi submetido a uma voltagem de 80 V durante 1 hora.

Posteriormente, procedeu-se à coloração do gel numa solução de brometo de etídio (5 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) durante 5 min e a revelação das bandas foi efectuada através de um transiluminador de U.V a 366 nm Bio-Print equipado com o software para aquisição de imagem BioCapt da Vilber Lormat.

3.2.7.4. Quantificação do DNA por espectrofotometria

O DNA foi quantificado por fotometria num espectrofotómetro Hitachi U – 2000. A absorvência de uma solução de DNA foi lida aos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A densidade óptica de 1 U a 260 nm corresponde aproximadamente a uma concentração de DNA de 50 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$.

A razão de $\text{ABS}_{260} / \text{ABS}_{280}$ dá uma indicação da pureza do teste, sendo o valor óptimo 1,8 (Sambrook *et al.*, 1989).

3.2.7.5. Análise por MSP – PCR.

A amplificação das amostras de DNA foi efectuada por MSP-PCR tendo sido utilizado como oligonucleótido iniciador (“primer”) uma sequência do fago M13 com 15 pares de bases (pb). O “primer” designado por M13 (Invitrogene) possuía a seguinte sequência: 5'- GAG GGT GGC GGT TCT - 3'.

Na reacção de amplificação, o DNA genómico a analisar ($25 \text{ ng}.\mu\text{L}^{-1}$) foi incubado com uma mistura de reacção constituída por: 2,5 μL de tampão de reacção (concentrado 10 X), 2,5 μL de solução de MgCl_2 (25 mM), 2,5 μL da mistura de dNTPs (2mM), 1 μL de “primer” M13 (50 μM), 1 Unidade de *Taq* DNA polimerase (enzima resistente a altas temperaturas extraído da bactéria *Thermus aquaticus*) (Fermentas) e água ultrapura (Easy pure UV/UF - Barnstead) esterilizada para um volume total de 25 μL .

As reacções foram efectuadas em duplicado. Foi preparado um tubo de controlo (Branco) em que o DNA foi substituído por água ultrapura esterilizada.

Procedeu-se à amplificação utilizando um termociclador Techne FPRB 102 (Progene).

O programa de amplificação compreende, após um período de desnaturação de 5 min a 94°C, um conjunto de 40 ciclos com a seguinte estrutura:

desnaturação – 1 min a 94  C

“annealing” – 1 min a 50  C

extensão – 2 min a 72  C

aos quais se segue um período de extensão final de 6 min a 72  C.

Os produtos de PCR foram guardados a 4 C até a execu o da electroforese em gel para posterior análise.

Os fragmentos amplificados foram separados por electroforese em gel de agarose a 1,2% em TBE 1X concentrado. Os geis foram carregados com 5  L de cada amostra de DNA amplificado adicionada de 5  L de corante 1X (**Anexo I - C**). Como marcador de massas molares utilizou-se o padrão de DNA 100 bp Plus (Fermentas) com a concentra o de 0,5 mg DNA por mL diluído de 1/10 com soluço de corante 1X.

O gel foi submetido a uma voltagem de 90 V durante 3 h. Após colora o numa soluço de brometo de etídio (5  g.mL⁻¹) durante 5 min o gel foi observado sob luz ultravioleta a 366 nm utilizando uma câmara de UV Bio-Print e a imagem foi integrada com recurso ao sistema BioCapt Vilber Lourmat acoplado a um computador.

A análise das bandas para análise da homologia através da correla o de Pearson e constru o de dendogramas baseado no grau de similaridade) através do método UPMGA (unweighted pair group method with arithmetic averages) foi efectuada recorrendo ao software Bionumerics II (Applied Maths).

3.2.8. Caracterização das estirpes fúngicas *Gongronella* sp. e *Rhizopus stolonifer* por métodos moleculares

Neste estudo foram comparados os perfis moleculares das estirpes *Gongronella* sp. e *Rhizopus stolonifer* isoladas antes e após o processo de selecção por comparação dos respectivos perfis electroforéticos obtidos por MSP-PCR com o objectivo de avaliar se houve alguma alteração a nível molecular das estirpes após exposição ao fungicida comercial (metalaxil 10% p/p e folpete 40% p/p) durante os ensaios de enriquecimento.

3.2.8.1. Organismos em estudo

Os fungos em estudo foram as estirpes de *Gongronella* sp. nativa (isolada do solo) e a submetida ao enriquecimento com o fungicida e as estirpes de *Rhizopus stolonifer* nativa (isolada do solo) e a submetida ao enriquecimento com o fungicida. As estirpes de *Rhizopus stolonifer* foram cultivadas em MEA, durante 5 dias, a 25°C e as estirpes de *Gongronella* spp. foram cultivadas em PDA, durante 7 dias a 25°C.

3.2.8.2. Extracção do DNA

O protocolo utilizado para o isolamento do DNA das estirpes de *Gongronella* sp. e de *Rhizopus stolonifer* foi adaptado a partir do método das microesferas (Sambrook *et al.*, 1989) e do método do tiocianato de guanidina (adaptado de Pitcher *et al.*, 1989), como se descreveu na **secção 3.2.7.2.**

3.2.8.3. Avaliação da integridade do DNA e quantificação

A avaliação da qualidade do DNA em termos da dimensão média dos fragmentos foi efectuada através de uma electroforese do DNA extraído em gel de agarose a 1% (p/v) como se descreveu na **secção 3.2.7.3**.

O DNA foi quantificado por fotometria num espectrofotómetro Hitachi U-2000, tendo sido efectuadas leituras de absorvência aos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, como se indicou na **secção 3.2.7.4**.

3.2.8.4. Análise por MSP - PCR.

A amplificação das amostras de DNA foi efectuada por MSP-PCR tendo também sido utilizado como oligonucleótido iniciador o “primer” designado por M13 (Invitrogene) com 15 pares de bases (pb) e a seguinte sequência: 5´- GAG GGT GGC GGT TCT - 3´.

A reacção de amplificação do DNA genómico foi efectuada segundo o protocolo descrito na **secção 3.2.7.5**.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Enriquecimento selectivo de espécies tolerantes em cultura mista em meio líquido

O resultado do enriquecimento selectivo em meio líquido encontra-se esquematizado na **tabela 3.1**.

Tabela 3.1 – Efeito das diferentes concentrações de fungicida comercial no crescimento das doze estirpes fúngicas isoladas, em meio de extracto de malte líquido (Merck, pH 8).

((+) observou-se crescimento (-) não se observou crescimento).

Estirpes fúngicas	Concentração de fungicida comercial (mg.L ⁻¹)							
	(metalaxil 10% p/p; folpete 40% p/p)							
	100	200	400	600	800	1000	1250	1500
<i>Aspergillus niger</i>	+	+	+	--	--	--	--	--
<i>Aspergillus</i> sp. 1	+	+	+	--	--	--	--	--
<i>Fusarium oxysporum</i>	+	+	--	--	--	--	--	--
<i>Gliocladium catenulatum</i>	+	+	--	--	--	--	--	--
Micélio estéril 1	+	+	+	+	--	--	--	--
Micélio estéril 2	+	+	--	--	--	--	--	--
Micélio estéril 3	+	+	+	+	+	+	+	--
Micélio estéril 4	+	+	--	--	--	--	--	--
<i>Penicillium</i> sp. 1	+	+	+	+	--	--	--	--
<i>Penicillium</i> sp. 2	+	+	+	+	--	--	--	--
<i>Penicillium</i> sp. 3	+	+	+	--	--	--	--	--
<i>Rhizopus stolonifer</i>	+	+	+	+	+	+	+	+

Das 12 estirpes isoladas do **solo A**, apenas 5 estirpes apresentaram capacidade de resistir a concentrações de fungicida comercial de 600 mg.L⁻¹ e duas dessas estirpes, *Rhizopus stolonifer* e micélio estéril 3 apresentaram tolerância a concentrações muito superiores de fungicida comercial (1250 e 1500 mg.L⁻¹). Não se observou crescimento para concentrações de fungicida comercial superiores a 1500 mg.L⁻¹.

No entanto, é de referir que o crescimento de *Rhizopus stolonifer* e do micélio estéril 3 no meio sólido utilizado para detectar os fungos presentes nas diferentes concentrações de fungicida utilizadas, foi gradualmente menor mas os micélios apresentaram uma morfologia normal, embora com esporulação reduzida.

Nesta fase e para o prosseguimento do trabalho foram escolhidas as cinco estirpes mais resistentes, *Penicillium* sp. 1 e 2, micélios estéril 1 e 3 e *Rhizopus stolonifer*, tendo sido efectuados ensaios de confirmação em meio sólido com estas estirpes.

3.3.2. Ensaios de confirmação em meio sólido com determinação dos valores de EC₅₀ e selecção de estirpes fúngicas.

A capacidade de resistir aos fungicidas metalaxil e folpete pelas estirpes seleccionadas no passo anterior foi confirmada em cultura pura.

A influência de diferentes concentrações de fungicida no crescimento dos cinco fungos testados em meio sólido foi avaliada por determinação da percentagem de inibição que foi calculada segundo a expressão apresentada na **secção 3.2.4**.

A representação gráfica da inibição (%) *versus* o logaritmo da concentração de fungicida (**Figuras 3.2 e 3.3**) permitiu obter uma correlação linear com a existência de duas zonas de inibição para os fungos testados, zona A e zona B, com variação do declive das rectas obtidas com a concentração de fungicida em estudo, indicando uma menor resistência para concentrações superiores de fungicida.

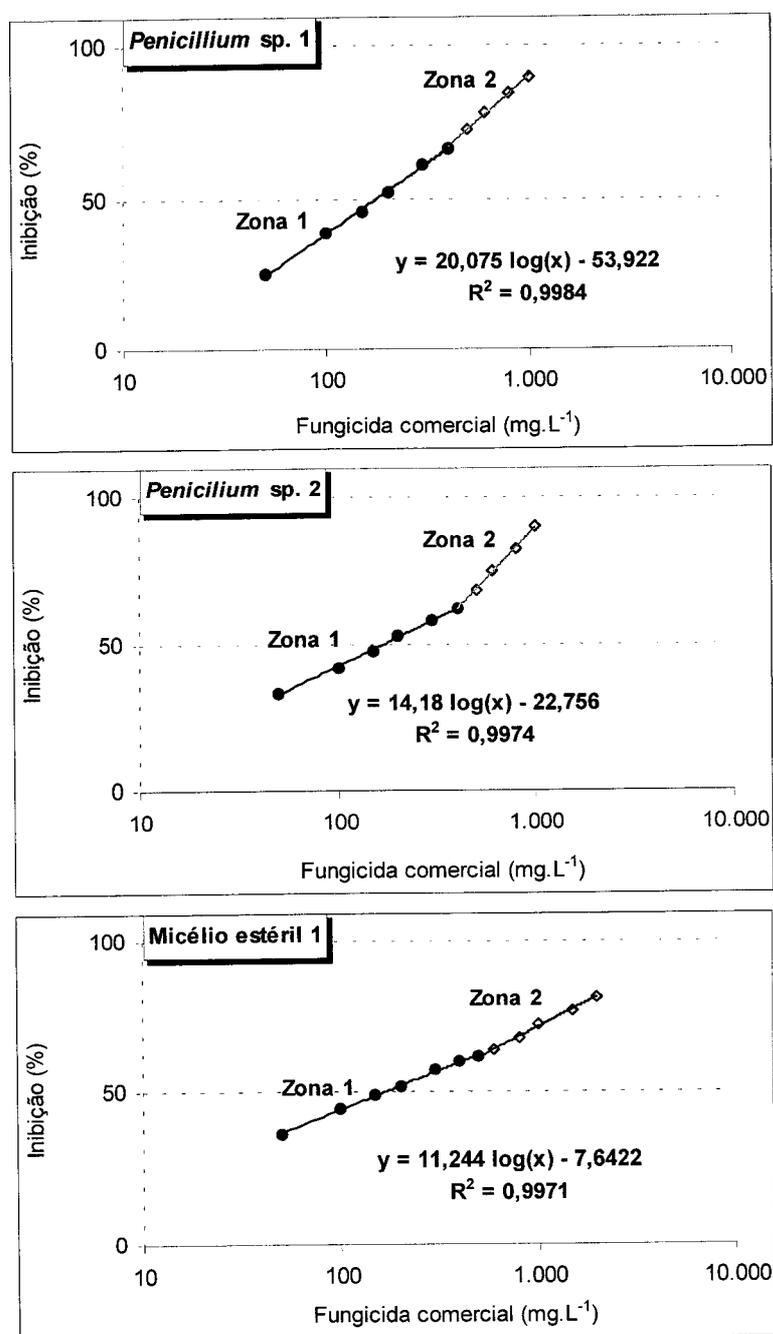


Figura 3.2– Representação gráfica da percentagem de inibição em função do logaritmo da concentração de fungicida comercial (mg.L⁻¹) contendo metalaxil (10% p/p) e folpete (40% p/p) para os fungos *Penicillium* sp. 1 e sp. 2 e micélio estéril 1. **Zona 1** – porção da curva em que o fungicida apresentou um determinado efeito inibitório (pontos assinalados a ●). **Zona 2** - porção da curva em que o fungicida apresentou um efeito inibitório superior (pontos assinalados a ◇). As equações das rectas e coeficientes de correlação apresentadas foram as obtidas para os pontos da **zona 1**. Para o cálculo do EC₅₀ foi utilizada a **zona 1** assinalada nos gráficos que é a que inclui os 50 % de inibição.

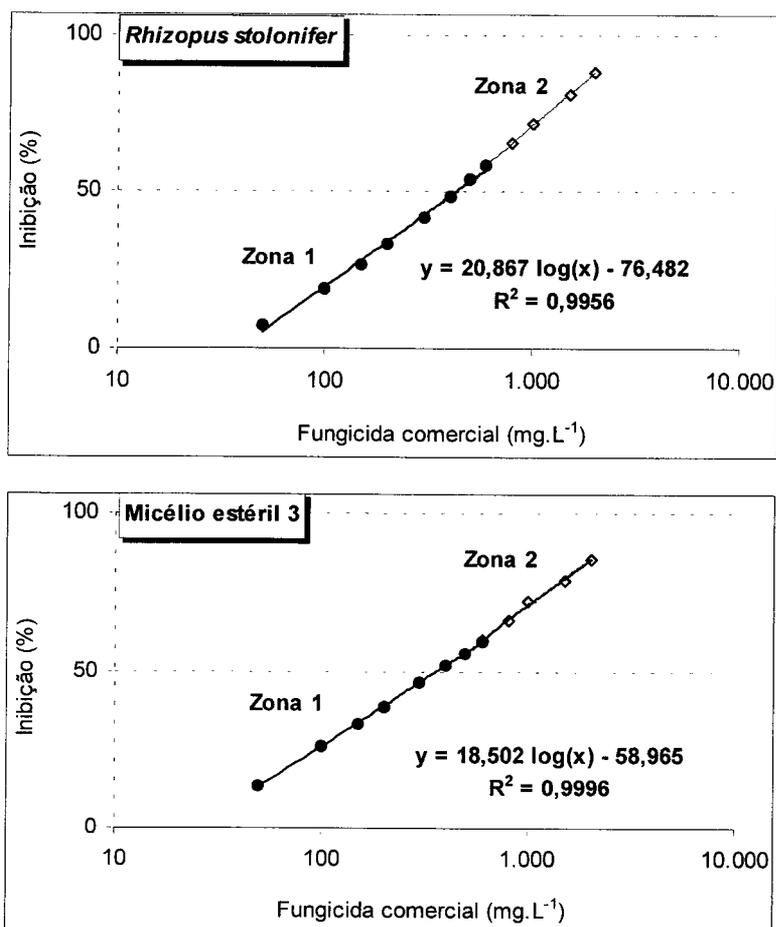


Figura 3.3 – Representação gráfica da percentagem de inibição em função do logaritmo da concentração de fungicida comercial (mg.L⁻¹) contendo metalaxil (10% p/p) e folpete (40% p/p) para os fungos *Rhizopus stolonifer* e micélio estéril 3. **Zona 1** – porção da curva em que o fungicida apresentou um determinado efeito inibitório (pontos assinalados a ●). **Zona 2** - porção da curva em que o fungicida apresentou um efeito inibitório superior (pontos assinalados a ◇). As equações das rectas e coeficientes de correlação apresentadas foram as obtidas para os pontos da **zona 1**. Para o cálculo do EC₅₀ foi utilizada a **zona 1** assinalada nos gráficos que é a que inclui os 50 % de inibição e a equação apresentada é referente a esta zona de inibição (pontos assinalados a ●).

De forma a obter uma base numérica que permita a escolha das estirpes fúngicas mais resistentes ao fungicida comercial utilizado (metalaxil 10% p/p; folpete 40% p/p) foram calculados os valores de EC_{50} para cada um dos fungos, ou seja, a concentração efectiva de fungicida comercial em que se obtém 50% de inibição do crescimento.

Para cálculo dos valores de EC_{50} foram utilizados os pontos dos gráficos das **figuras 3.2 e 3.3** que abrangem a porção da relação em que se obtém 50% de inibição do crescimento da colónia (pontos assinalados a ●). Assim, os valores de EC_{50} foram calculados por interpolação gráfica da regressão linear obtida para a primeira zona de variação do declive (**zona 1**). As equações das rectas utilizadas para os referidos cálculos são apresentadas nos respectivos gráficos das **figuras 3.2 e 3.3**.

Os valores de EC_{50} calculados para cada um dos fungos em estudo estão apresentados na **tabela 3.2**.

Tabela 3.2- Registo dos valores de EC_{50} ($mg.L^{-1}$ de fungicida comercial) para os fungos em estudo. Cada ponto representa a média de 3 repetições \pm o desvio padrão.

Fungos em estudo	EC_{50} fungicida comercial ($mg.L^{-1}$)
Micélio estéril 1	169,34 \pm 0,30
Micélio estéril 3	361,17 \pm 0,44
<i>Penicilium</i> sp. 1	177,10 \pm 0,20
<i>Penicilium</i> sp. 2	136,00 \pm 0,25
<i>Rhizopus stolonifer</i>	428,93 \pm 0,24

Por observação da **tabela 3.2** observamos que o fungo *Rhizopus stolonifer* apresentou o valor de EC_{50} mais elevado, 429 mg.L^{-1} de fungicida comercial sendo, portanto, o fungo mais resistente à mistura comercial de metalaxil e folpete em estudo.

A estirpe classificada como micélio estéril 3 apresentou um valor de EC_{50} de 362 mg.L^{-1} , que embora tenha sido inferior ao obtido para o *R. stolonifer* foi bastante superior aos valores de EC_{50} obtidos para os fungos *Penicillium* sp. e micélio estéril 1. A estirpe designada por *Penicillium* sp. 2 apresentou um valor de EC_{50} de 136 mg.L^{-1} com a formulação comercial, indicando que dos cinco fungos em estudo esta estirpe foi a que apresentou uma tolerância inferior aos fungicidas metalaxil e folpete.

Os resultados obtidos estão de acordo com os registados nos ensaios de enriquecimento selectivo em meio líquido (**Tabela 3.1**) uma vez que estes fungos foram precisamente os que tinham sido detectados nas concentrações mais elevadas de fungicida, sendo portanto os mais tolerantes.

3.3.3. Identificação do micélio estéril 3

Como não foi possível identificar o fungo designado por micélio estéril 3, por este não ter apresentado formação de estruturas reprodutoras nos meios testados após o isolamento do solo A (**secção 2.2.5**), para tentar induzir a esporulação e, assim, proceder à sua identificação, efectuaram-se os ensaios descritos na **secção 3.2.7**.

Os resultados obtidos no ensaio de indução da esporulação estão representados na **tabela 3.3**. Neste estudo, observou-se a formação de esporângios nas placas de Petri que continham folhas de videira e solo. A frequência de formação de esporângios, embora baixa, foi superior quando o meio utilizado foi PDA, relativamente ao meio de MEA, onde muito dificilmente se visualizaram a formação destas estruturas.

Tabela 3.3 – Registo das observações dos ensaios realizados para indução da esporulação. (- não se observaram esporângios; ± esporângios muito raros; + observaram-se esporângios).

		Presença de esporângios	
Agar (1,5 %) +	Constituintes da videira	Folhas	+
		Pecíolos	±
		Frutificações	-
	Grãos de trigo	-	
	Grãos de milho	-	
	Grãos de arroz	-	
Agar (1,5 %) + solo autoclavado (incorporação)		+	

O micélio foi repicado dos locais onde se observaram esporângios para novas placas contendo meio de PDA e, após incubação, por observação macroscópica e microscópica das colónias, utilizando as chaves taxonómicas adequadas (Smith, 1969; Domsch *et al.*, 1980) foi possível classificar o fungo, inicialmente designado por micélio estéril 3, como sendo uma espécie do género *Gongronella*. Os fungos deste género apresentam, geralmente, colónias com crescimento relativamente lento, estruturas de suporte e rizóides pouco diferenciados, esporangióforos erectos e muitas das vezes ramificados. O esporângio é, geralmente, globoso e apresenta a columela reduzida (Domsch *et al.*, 1980).

As principais características da estirpe *Gongronella* sp. são apresentadas na **figura**

3.4.

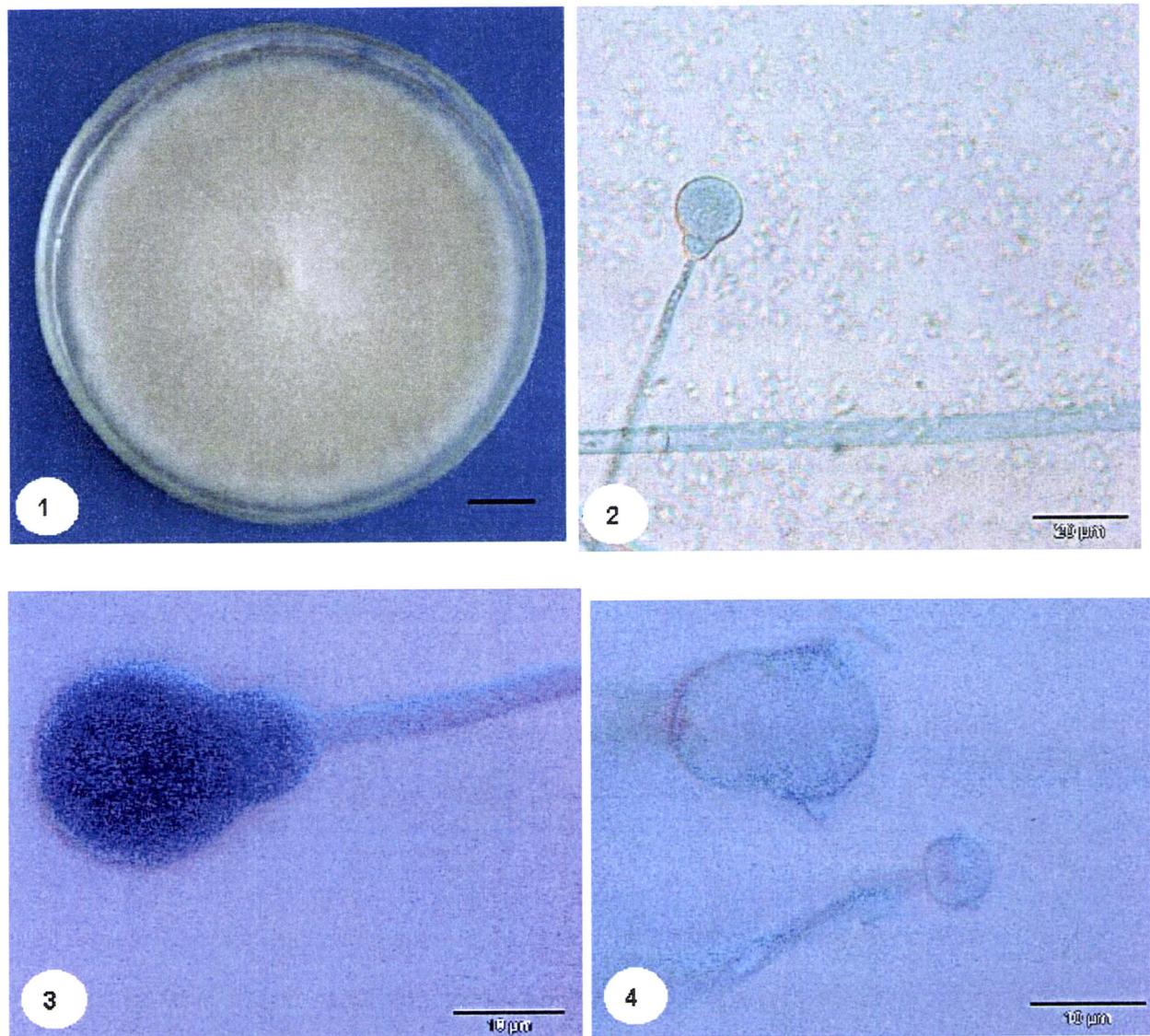


Figura 3.4 - Algumas das características macroscópicas e microscópicas da *Gongronella* sp.
(1) Aspecto geral da colônia em PDA após 8 dias de crescimento a 25 °C (barra = 12 mm);
(2) Aspecto geral do esporângio, hifa e esporos; (3) esporângio maduro; (4) parte do esporângio já sem esporos, onde se observa a columela e restos de membrana.

3.3.4. Selecção das estirpes fúngicas com capacidade de resistir a concentrações elevadas de metalaxil e de folpete

Nos ensaios de selecção em meio líquido e confirmação em meio sólido foram isoladas duas estirpes fúngicas por resistirem a concentrações mais elevadas de fungicida e, simultaneamente, apresentarem valores de EC_{50} mais elevados: *Rhizopus stolonifer* e o fungo designado por micélio estéril 3, posteriormente, identificado como *Gongronella* sp., após indução da esporulação.

Como já foi referido no **capítulo 1**, muitas vezes, a capacidade de tolerar elevadas concentrações de um xenobiótico está associada à existência de um metabolismo efectivo de degradação ou de eliminação desse composto por parte dos fungos tolerantes. Por essa razão, os fungos seleccionados para o prosseguimento dos estudos de degradação foram as estirpes *Rhizopus stolonifer* e *Gongronella* sp.

Ambas as estirpes seleccionadas pertencem ao grupo dos Zigomicetes e à ordem Mucorales e foram identificadas como sendo *Gongronella* sp. (**Figura 3.4**) e *Rhizopus stolonifer* (**Figura 3.5**).

Os Zigomicetes são normalmente fungos terrestres, frequentemente isolados a partir de amostras de solo e têm como principais características serem constituídos por hifas cenocíticas, com paredes celulares quitinosas, terem reprodução assexuada através de esporos imóveis produzidos no esporângio e propagação sexuada através de zigósporos produzidos pelo gamentângio, resultante da fusão de duas hifas somáticas (Domsch, 1980).

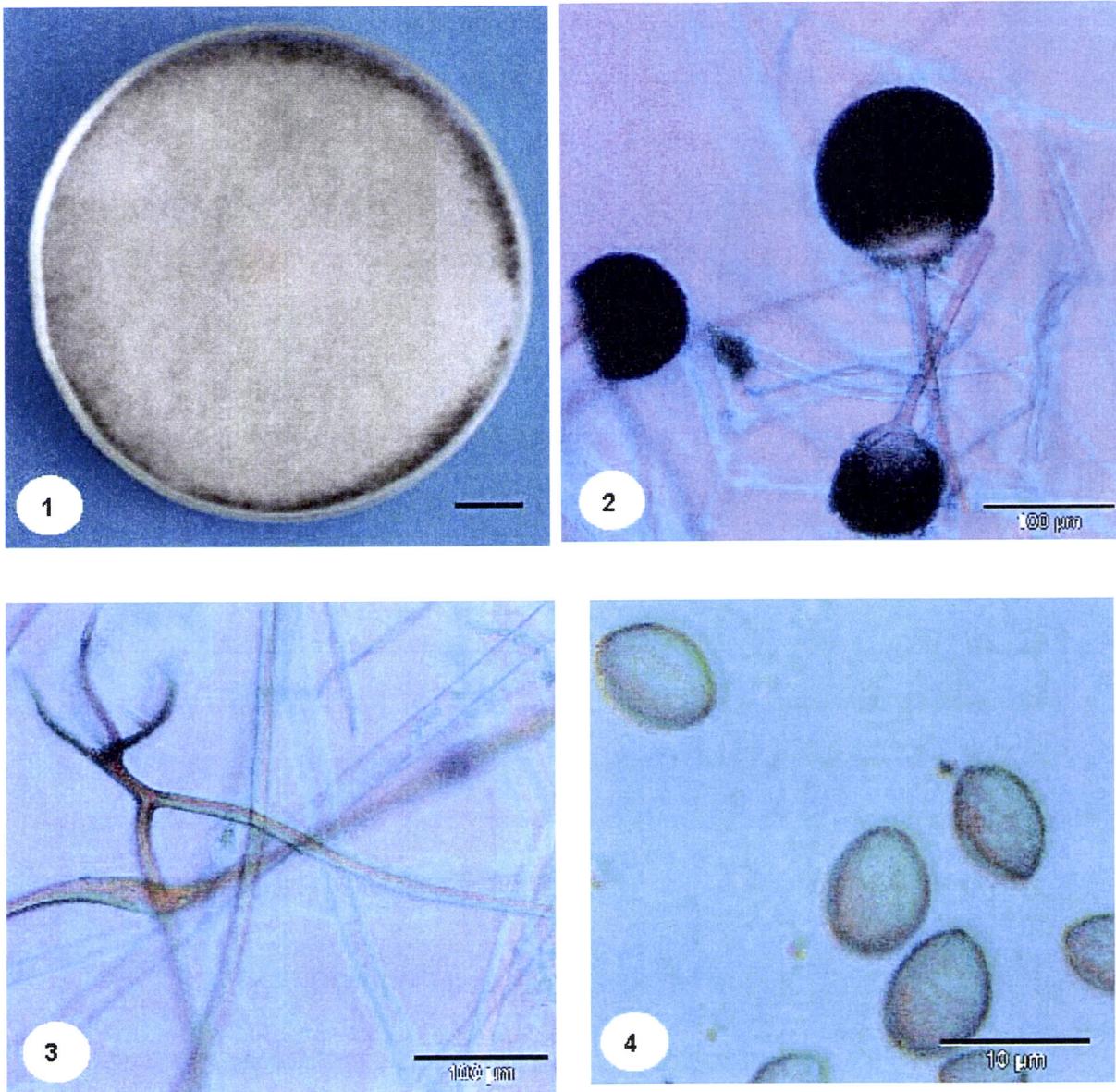


Figura 3.5 - Algumas das características macroscópicas e microscópicas do *R. stolonifer*.
(1) Aspecto geral da colónia em MEA após 6 dias de crescimento a 25°C (barra = 12 mm);
(2) Aspecto geral do esporângio maduro (3) aspecto geral dos rizóides (imagem invertida);
(4) esporangiósporos

3.3.5. Identificação da estirpe *Gongronella* sp. por MSP-PCR

Como não foi possível identificar a estirpe de *Gongronella* a nível de espécie, mesmo após a indução da esporulação, procedeu-se, de uma forma preliminar, à comparação dos perfis electroforéticos, obtidos após MSP-PCR (secção 3.2.7.5), da estirpe de *Gongronella* isolada do solo relativamente às estirpes padrão descritas na bibliografia: *Gongronella butleri* (ATCC 8989) e *Gongronella lacrispora* (ATCC 24412)

3.3.5.1. Análise da integridade do DNA

A qualidade de DNA é uma das características mais importantes nos ensaios de “fingerprinting” como o RAPD e MSP-PCR, uma vez que a sua degradação e contaminação poderão resultar numa ausência total de amplificação.

O DNA extraído nas condições do protocolo utilizado (secção 3.2.7.2), apresentou-se muito pouco fragmentado e sem impurezas (Figura 3.6). Para cada uma três estirpes de *Gongronella* obteve-se uma banda de grande intensidade representando um fragmento superior a 10 Kb. Para cada uma das amostras, os valores médios da razão Abs_{260}/Abs_{280} foram de $1,7 \pm 0,1$.

3.3.5.2. Caracterização dos fragmentos de MS-PCR

Os produtos de PCR resultantes de cada reacção de amplificação apresentaram um número variável de bandas compreendidas entre os 2000 e os 200 pb.

Como se obtiveram vários fragmentos por reacção de amplificação, foi possível proceder à avaliação da similaridade entre as estirpes e construir dendogramas utilizando o coeficiente de correlação de Pearson, através do programa Bionumerics (Applied Maths). Os dendogramas obtidos estão apresentados na figura 3.8.

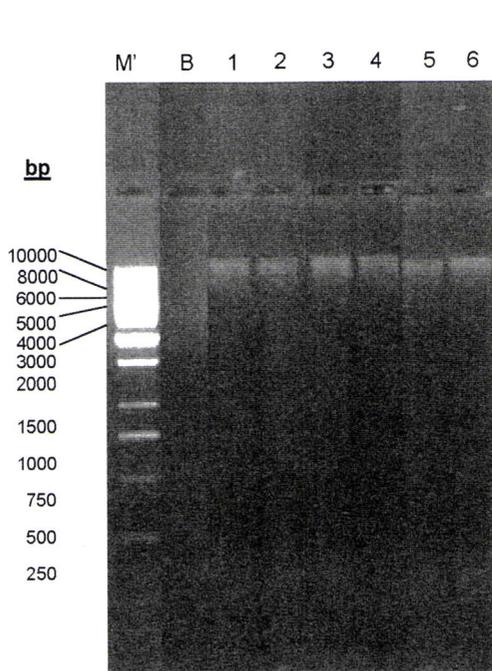


Figura 3.6 – Electroforetograma do DNA extraído das estirpes de *Gongronella*.

M' – Marcador de DNA 1 Kb; B – Branco; 1 e 2 – *Gongronella* sp.; 3 e 4 – *Gongronella butleri*; 5 e 6 – *Gongronella lacrispora*

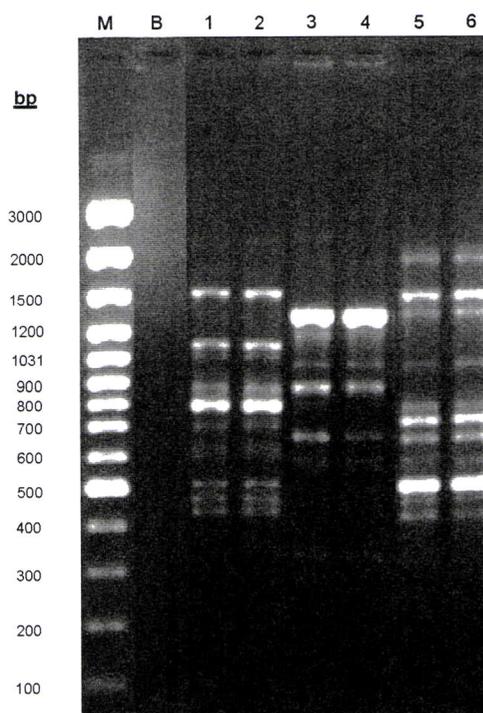


Figura 3.7 – Electroforetogramas obtidos após MS-PCR para as estirpes de *Gongronella*

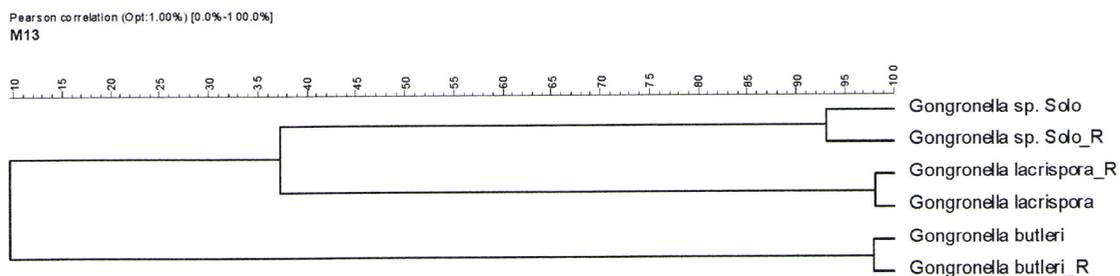


Figura 3.8 – Dendrograma do perfil da electroforese obtida após MS-PCR para a estirpe *Gongronella* sp. isolada do solo e para as estirpes padrão de *Gongronella butleri* e *G. lacrispora*.

Os resultados obtidos mostraram que apesar da *Gongronella* isolada do solo apresentar um perfil molecular mais semelhante ao da *Gongronella lacrispora* do que ao da *Gongronella butleri* ainda tinham um grau de diferença superior a 60% e, por outro lado, o grau de proximidade entre os dois isolados de *Gongronella* sp. foi de 90%, fazendo supor que a estirpe isolada pode ser uma nova espécie. A confirmar está a diferença observada nos perfis moleculares das três estirpes (**Figura 3.7**). O fungo *Gongronella* sp. apresentou uma banda intensa correspondente a cerca de 1500 bp e uma outra correspondente a um fragmento de 800 bp que também se observaram na *G. lacrispora* mas que não se observaram na *G. butleri*, embora esta última banda seja muito mais intensa na *Gongronella* sp do que na *G. lacrispora*. O fungo isolado do solo apresentou também um fragmento com dimensões aproximadas a 1100 bp que não se observou para mais nenhuma das estirpes utilizadas no estudo e um fragmento de 900 bp que também pareceu estar presente na *G. butleri* embora a banda correspondente apresente maior intensidade nesta estirpe. Nas estirpes de *Gongronella* sp. e de *G. lacrispora*, visualizam-se também três fragmentos com dimensões compreendidas entre os 500 bp e os 400 bp, embora o fragmento de 500 bp corresponda a uma banda muito mais intensa na *G. lacrispora* do que na estirpe isolada do solo.

3.3.6. Caracterização molecular das estirpes *Gongronella* sp. e *Rhizopus stolonifer* isoladas antes e após o processo de enriquecimento selectivo.

Após a identificação e avaliação dos perfis moleculares da estirpe *Gongronella* sp. isolada do solo com as duas estirpes padrão descritas para o género *Gongronella*, nesta secção pretendeu-se comparar o perfil molecular de cada uma das duas espécies seleccionadas, *Rhizopus stolonifer* e *Gongronella* sp. após o seu isolamento no solo e após o ensaio de enriquecimento.

Com este estudo pretendeu-se observar se teriam ocorrido possíveis mutações genéticas após o ensaio de selecção que poderiam ter induzido determinados enzimas com capacidade de degradar o metalaxil e, justificar assim, um aumento da capacidade de degradação após o enriquecimento selectivo. Para tal utilizámos a mesma técnica de “fingerprinting” tendo sido comparados os perfis de amplificação por MSP-PCR dos fungos antes e após o processo de selecção.

A **figura 3.9** mostra o resultado da electroforese das amostras de DNA obtidas pelo método de extracção utilizado. As amostras apresentaram bandas de grande intensidade correspondentes a fragmentos de DNA superiores a 10 Kb.

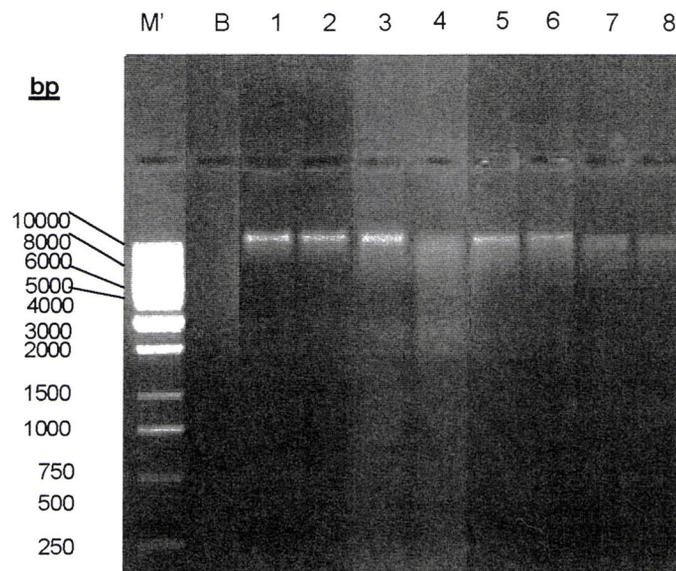


Figura 3.9 - Electroforese do DNA obtido das estirpes de *Gongronella* sp e *Rhizopus stolonifer*.

M' - Marcador de DNA 1 Kb;

B - Branco;

1 e 2 - *Rhizopus stolonifer* solo;

3 e 4 - *Rhizopus stolonifer* após o enriquecimento;

5 e 6 - *Gongronella* sp. solo;

7 e 8 - *Gongronella* sp. após o enriquecimento.

Na **figura 3.10** estão apresentados os perfis moleculares dos fungos isolados antes e após o enriquecimento quando submetidos a MS-PCR.

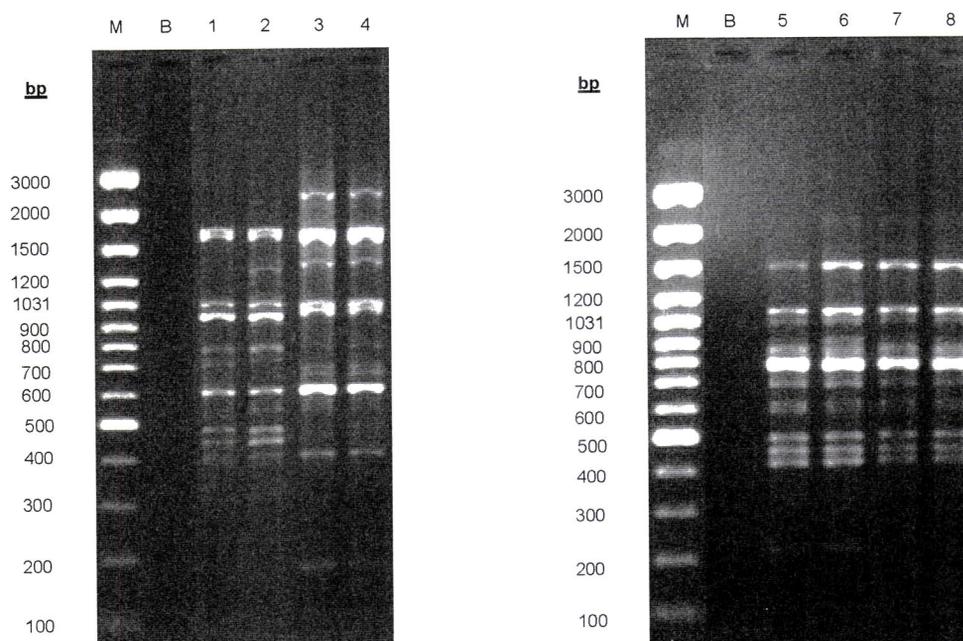


Figura 3.10 – Electroforetogramas obtidos após MS-PCR para as estirpes de fungos seleccionados obtidas antes e após o enriquecimento selectivo.

1 e 2 – *Rhizopus stolonifer* isolado de amostras de solo A

3 e 4 – *Rhizopus stolonifer* isolado após os ensaios de enriquecimento selectivo

5 e 6 – *Gongronella sp.* isolada após os ensaios de enriquecimento selectivo

7 e 8 – *Gongronella sp.* isolada de amostras de solo A

Para avaliar o grau de similaridade entre as estirpes isoladas do solo e as estirpes obtidas após o ensaio de enriquecimento procedeu-se à construção de dendogramas através do Software Bionumerics (Applied Maths), tendo sido utilizado o coeficiente de similaridade de Pearson (baseado na intensidade das bandas) e o método UPMGA (unweighted pair group method with arithmetic averages) para agrupamento das estirpes.

Os dendogramas obtidos para a espécie *Rhizopus stolonifer* e para a espécie *Gongronella* sp. estão apresentados na **figura 3.11**.

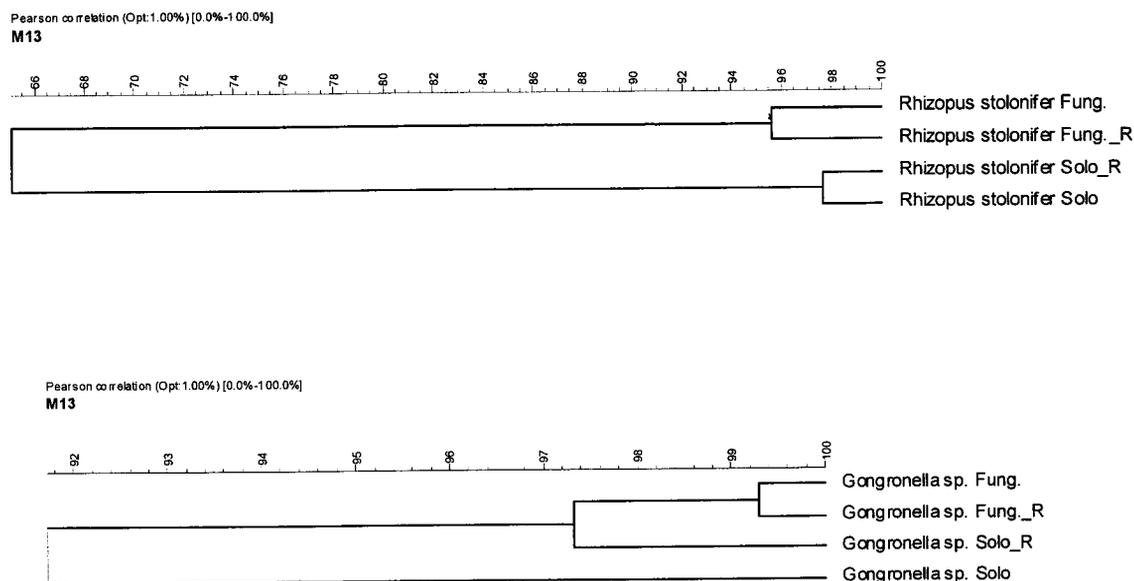


Figura 3.11– Dendogramas dos perfis de electroforese obtidos após MS-PCR para as estirpe de *Rhizopus stolonifer* e de *Gongronella* sp. obtidas antes e após o ensaio de seleção. (Fung – estirpe obtida após o enriquecimento selectivo e conservada no meio com fungicida; Solo – estirpe isolada das amostras de solo e conservada no meio sem fungicida R –Repetição).

Os perfis moleculares obtidos para as duas estirpes de *Rhizopus stolonifer* em estudo (uma isolada do solo e a outra obtida após o ensaio de enriquecimento selectivo) apresentaram algumas diferenças, quer na intensidade de algumas bandas presentes para as duas estirpes, quer na existência de bandas diferentes para estas estirpes. Assim, na estirpe obtida após o ensaio de enriquecimento selectivo, observou-se a

existência de 3 bandas que não foram detectadas na estirpe isolada a partir das amostras de solo, uma banda correspondente a fragmentos de dimensões compreendidas entre 2000 e 3000 bp, outra correspondente a fragmentos de 1200 bp e a última, muito ténue, representando fragmentos de dimensões inferiores a 400 bp. Por outro lado, a estirpe isolada das amostras de solo apresentou 3 bandas que representam fragmentos de dimensões compreendidas entre 400 e 500 bp enquanto que a estirpe obtida por selecção apresentou apenas uma banda neste intervalo.

A confirmar estes resultados, o dendograma obtido para as estirpes de *Rhizopus stolonifer* apresentou um grau de similaridade de cerca de 65% para as duas estirpes em estudo enquanto que os dois replicados de *Rhizopus stolonifer* isolados nas amostras de solo apresentaram um grau de semelhança de 96% e os replicados da estirpe obtida após a selecção apresentaram um grau de semelhança de 99% (**Figura 3.11**).

Relativamente às estirpes de *Gongronella* sp. em estudo, uma isolada a partir das amostras de solo e outra obtida após o ensaio de enriquecimento selectivo, obtiveram-se perfis electroforéticos semelhantes, tendo sido observado igual número de bandas, para cada uma delas, que representam fragmentos compreendidos entre 1500 e 400 bp de intensidade semelhante (**Figura 3.10**).

A estirpe de *Gongronella* sp. isolada após o enriquecimento apresentou, no entanto, uma banda muito ténue mas presente nos dois replicados com dimensões inferiores a 200 bp e que não está presente na estirpe isolada das amostras de solo. A confirmar estes resultados, o dendograma (**Figura 3.11**) apresentou um grau de similaridade superior a 90% para estas duas estirpes.

O grau de similaridade entre os dois replicados de *Gongronella* sp. isolada no solo foi de 97% e entre os dois isolados da estirpe obtida por enriquecimento selectivo foi superior a 99%.

3.4. DISCUSSÃO

Para que um organismo consiga degradar um determinado composto, xenobiótico ou não, deve apresentar determinadas propriedades fisiológicas e bioquímicas que lhe permitam tolerar elevadas concentrações desse composto. Assim, a estratégia utilizada para a selecção de fungos que apresentaram capacidade para degradar o metalaxil e o folpete passou primeiro pela pesquisa de estirpes tolerantes a elevadas concentrações destes compostos.

A determinação dos valores de EC_{50} (concentração mínima efectiva para a qual se verifica um crescimento igual a 50%) é geralmente utilizada como critério de selecção das estirpes que apresentam maior capacidade para tolerar um determinado composto tóxico (Ellis *et al.*, 1982; Gadd, 1986).

Os resultados obtidos nos ensaios de enriquecimento (**secções 3.3.1 e 3.3.2**) mostraram que as estirpes *Rhizopus stolonifer* e micélio estéril 3 foram as que conseguiram, em meio líquido, tolerar concentrações superiores a 1000 mg.L^{-1} de fungicida comercial (metalaxil 10% p/p e folpete 40% p/p) e também foram aquelas que apresentaram uma capacidade para tolerar concentrações mais elevadas desse fungicida em meio sólido, apresentando valores superiores de EC_{50} .

A estirpe micélio estéril 3 foi assim designada por não apresentar formação de estruturas reprodutoras em MEA, pelo que, se submeteu esta estirpe a ensaios de indução de esporulação e, posteriormente se identificou como *Gongronella* sp.. Os fungos do género *Gongronella* distribuem-se pelas várias parte do globo terrestre tendo já sido isolados, em outros trabalhos, a partir de solos muitos deles com culturas agrícolas e cujos valores de pH oscilaram entre 6 e 7 (Aube & Gagnon, 1971; Domsch *et al.*, 1980).

Nos estudos de agrupamento utilizados para comparar o grau de similaridade da estirpe de *Gongronella* sp. com as duas estirpes padrão descritas (*G. lacrispora* e *G. butleri*) e nos estudos de comparação dos perfis moleculares dos fungos seleccionados com as respectivas estirpes isoladas do solo foi necessário proceder à extracção do DNA dos fungos em estudo (Meyer *et al.*, 1991; Martin *et al.*, 2000).

Nos fungos filamentosos a principal dificuldade de extracção do DNA prende-se com a rigidez / complexidade da parede celular que requer a utilização de métodos físicos (maceração, microesferas, French press) ou hidrólise com enzimas. São também problemas adicionais o fraco rendimento em termos de quantidade extraída a partir de determinados materiais e a existência de enzimas hidrolíticas (nucleases) e de grande quantidade de polissacáridos e pigmentos presentes nas paredes celulares destes organismos que impedem a solubilização do DNA durante os processos de extracção (Sambrook *et al.*, 1989). No entanto, o método utilizado permitiu, para as estirpes estudadas, ultrapassar estes problemas e obter DNA com um elevado grau de pureza (razão Ab_{260}/Ab_{280} de $1,7 \pm 0,1$) (Sambrook *et al.*, 1989) e em quantidade suficiente para poder ser amplificado por MSP-PCR (**Figuras 3.7 e 3.9**).

O método de MSP-PCR ou RAMP é um método de agrupamento de espécies, que através da aplicação de “primers” dirigidos para sequências satélite em reacções de amplificação por PCR permite apenas avaliar perfis electroforéticos em que as bandas apresentadas reflectem o polimorfismo existente nestas regiões de DNA (Weising *et al.*, 1995; Martin *et al.*, 2000).

Por comparação dos perfis moleculares obtidos por amplificação (MSP-PCR) do DNA das estirpes de *Gongronella* sp isolada de amostras de solo e das estirpes padrão de *G. butleri* e *G. lacrispora* observou-se um grau de similaridade inferior a 40% para as estirpes de *Gongronella* sp e *G. lacrispora* e um grau de similaridade de 10% entre estas

duas e a de *G. butleri*. (**Figura 3.7**). Estes resultados indicam que *Gongronella* sp. poderá ser uma nova espécie do género *Gongronella*, embora, para confirmar esta afirmação seja necessário efectuar outros estudos, como por exemplo, estudos de confirmação por ITS-ARDRA (Internal Transcribed Spacer- Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) ou proceder à sequenciação das zonas ITS destes organismos, comparando com sequências já estabelecidas em bases de dados públicas, como por exemplo, a Genbank (Meyer & Mitchell, 1995; Caetano-Anollés & Gresshoff, 1997; Martin *et al.*, 1998).

Na comparação do perfil molecular das estirpes de *Gongronella* (**Figura 3.11**) não se observou diferenciação entre a estirpe isolada do solo e a estirpe submetida ao enriquecimento, tendo sido observado um grau de similaridade superior a 90% entre elas. Por esta razão, a capacidade que a estirpe enriquecida apresentou para degradar o metalaxil e o folpete não parece estar correlacionada com alterações a nível do genoma detectáveis por este método. No entanto, esta estirpe foi isolada de um solo que já tinha sido submetida a um elevado número de tratamentos, pelo que, a estirpe isolada já pode ter sido alvo de um processo de selecção *in situ*.

A análise dos perfis moleculares obtidos por MSP-PCR para as estirpes de *Rhizopus stolonifer* antes e após a selecção mostrou diferenças nos perfis electroforéticos, tendo sido obtido um grau de similaridade de apenas 65% (**Figura 3.11**). Assim, para o fungo *Rhizopus stolonifer* pode ter havido uma diferenciação entre a estirpe nativa e a estirpe submetida ao enriquecimento com o fungicida comercial que poderá indicar uma mutação genética, ou seja, ocorrência de alterações a nível molecular com indução de determinados enzimas que apresentem capacidade para degradar os fungicidas metalaxil e folpete.

Existem relativamente poucos estudos de biodegradação de metalaxil por estirpes isoladas e não se encontraram na literatura estudos sobre a biodegradação do folpete

nos solos. Mohapatra & Awasthi (1997) referem que culturas mistas de fungos isolados a partir de solos podem facilitar a biodegradação do metalaxil e Bailey & Coffey (1986) isolaram alguns fungos e bactérias que apresentaram capacidade para degradar o metalaxil mas não se encontrou nenhuma referência na bibliografia em relação à capacidade de degradação do metalaxil ou de folpete por estirpes de *Rhizopus* ou de *Gongronella*.

No entanto, Zeng *et al.* (1989) identificaram dois fungos (*Syncephalastrum racemosum* e *Cunningamella ellegans*) que pareceram ser activos na degradação do metalaxil, tendo sido o *Syncephalastrum racemosum* aquele que apresentou maior capacidade para degradar o metalaxil. É importante referir que estas estirpes pertencem ao grupo dos Zigomicetes (Domsch *et al.*, 1980) como acontece também com os fungos seleccionados neste trabalho (*Rhizopus* e *Gongronella*), pelo que pode haver alguma correlação entre os fungos deste grupo e a capacidade que apresentaram para degradar o metalaxil.

Estudos de biodegradação de hidrocarbonetos derivados de combustíveis referem que entre as estirpes de fungos isoladas a partir de solos contaminados foi detectada uma estirpe de *Gongronella butleri* que possui capacidade para degradar estes compostos, embora os fungos do género *Penicillium* e *Trichoderma* tenham sido predominantes e tenham apresentado maior capacidade para biodegradar estes compostos (Chaîneau *et al.*, 1999).

Outros estudos de degradação, efectuados com herbicidas dos grupos fenilureias e triazinas mostraram que fungos isolados a partir de solos contaminados com estes compostos apresentavam maior capacidade de degradar os pesticidas do que fungos isolados a partir de solos similares não contaminados (Bordjiba *et al.*, 2001). Nestes estudos o crescimento de microrganismos pertencentes aos géneros *Absidia* e *Fusarium*

não eram inibidos por altas doses de pesticidas mas sim estimulados, sendo algumas espécies do género *Absidia*, género também pertencente ao grupo dos Zigomicetes, as mais eficientes no processo de degradação (Bordjiba *et al.*, 2001).

Por terem sido previamente isolados de um solo com grande capacidade de degradar o metalaxil e o folpete e por conseguirem tolerar concentrações elevadas destes fungicidas, os fungos *Rhizopus stolonifer* e *Gongronella* sp. foram seleccionados para o prosseguimento dos estudos de degradação e serão utilizados nos ensaios de degradação realizados em meio aquoso e no solo, descritos nos capítulos 4 e 5 desta dissertação, com o objectivo de avaliar a capacidade de degradação destes fungos para os fungicidas em estudo.

CAPÍTULO 4

Estudos de degradação do metalaxil e do folpete em meio aquoso

4.1. INTRODUÇÃO

A capacidade de adaptação dos microrganismos a condições desfavoráveis de crescimento é um fenómeno conhecido, detectado em várias estirpes fúngicas que apresentaram capacidade para crescer em presença de alguns compostos xenobióticos e outros poluentes (Bordjiba *et al.*, 2001; Bending *et al.*, 2002; Siddique *et al.*, 2003). A elevada resistência que alguns microrganismos possuem para tolerar altas concentrações de xenobióticos está, na maioria das vezes, associada à capacidade para se adaptarem a esses compostos, desenvolvendo sistemas que lhes permitem transformá-los em metabolitos menos tóxicos ou mais facilmente elimináveis (Wayman & Parekh, 1990).

Como já foi referido no **capítulo 3**, os fungos isolados *Gongronella* sp. e *Rhizopus stolonifer* foram seleccionados após enriquecimento por terem conseguido resistir a concentrações elevadas de um fungicida comercial com metalaxil e folpete na sua composição.

Nos estudos descritos neste capítulo, cada estirpe seleccionada foi estudada num meio de cultura líquido com metalaxil ou folpete como principal fonte de carbono e em paralelo num meio com uma fonte adicional de carbono (glucose), para determinar periodicamente as taxas específicas de crescimento e as percentagens de fungicida remanescente.

Com estes estudos, pretendeu-se avaliar a capacidade dos microrganismos seleccionados para utilizar o metalaxil ou folpete como principal fonte de carbono, observar se a percentagem de fungicida degradado seria proporcional à concentração existente e, ainda, se a degradação seria ou não influenciada pela presença de um substrato facilmente assimilável, como a glucose.

Neste capítulo, foram também efectuados estudos para avaliar o comportamento do metalaxil como substrato para os microrganismos seleccionados. Alguns estudos sobre degradação de compostos tóxicos por microrganismos seleccionados referem que, apesar desses microbiota apresentarem capacidade para os degradar ou eliminar, em determinadas concentrações, esses compostos comportam-se como substratos inibitórios e apresentam um comportamento cinético que segue o modelo de inibição proposto por Haldane para os sistemas enzimáticos (Anselmo, 1992; Pereira, 1996).

Nos seus estudos cinéticos com enzimas, Haldane (1930) estabeleceu um modelo cinético para reacções enzimáticas onde se observava uma inibição pelo substrato do tipo competitivo, nas quais, para concentrações elevadas de substrato se formava um

complexo enzima-substrato-substrato (ESS) que não permitia a formação do produto final da reacção (Beltrame *et al.*, 1980).

Nas culturas descontínuas ou em “batch”, como se trata de um sistema fechado, os nutrientes não são renovados, nem os produtos resultantes do crescimento microbiano são retirados, à excepção dos gases. Como consequência, a fase exponencial da população terminará quando ocorrer a falta de um ou mais nutrientes essenciais e/ ou a acumulação de metabolitos (Wayman & Parekh, 1990). Na fase exponencial de crescimento, é possível determinar a taxa específica de crescimento (μ) através da equação:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu t$$

em que o declive corresponde ao valor da taxa específica de crescimento e a intercepção na origem fornece a concentração inicial de biomassa ($\ln X_0$) (Bailey & Ollis, 1986; Wayman & Parekh, 1990; Doran, 2000).

Embora não exista uma base teórica para a utilização do modelo proposto por Haldane em microrganismos, é possível utilizar este modelo para substratos inibitórios pois, como refere Andrews (1968), pode observar-se que a relação empírica estabelecida por Monod (1942), relacionando o efeito da concentração do nutriente limitante com a taxa específica de crescimento, é semelhante, na sua forma, à expressão de Michaelis-Menten, na qual se baseia a função de Haldane (Hill & Robinson, 1975).

O modelo de Monod considera que, se as condições físico-químicas do meio se mantiverem constantes, o crescimento microbiano está limitado pela concentração de um componente do meio denominado substrato limitante (S), pelo que a taxa específica de crescimento (μ) atinge o seu valor máximo ($\mu_{m\acute{a}x}$) para concentrações saturantes de substrato limitante (S); para concentrações não saturantes de S a taxa específica de

crescimento (μ) diminui com o decréscimo de S, desde $\mu_{\text{máx}}$ até zero, seguindo um andamento hiperbólico, com uma representação gráfica que segue a cinética de Michaelis-Menten (Andrews, 1968).

No entanto, a relação apresentada por Monod não é válida para os substratos que são limitantes para o crescimento em baixas concentrações e que são inibitórios para os microrganismos em altas concentrações (Andrews, 1968; Hill & Robinson, 1975). Assim, para ilustrar o comportamento dinâmico dos microrganismos que utilizam um substrato inibitório, para concentrações elevadas de substrato, pode utilizar-se a função, tal como foi proposta por Haldane para a inibição de enzimas, para o cálculo dos parâmetros cinéticos do crescimento microbiano (Hill & Robinson, 1975).

Por analogia com a cinética de Haldane, em presença de crescimento microbiano à custa de substratos inibitórios é possível calcular a taxa específica de crescimento (μ) de acordo com a equação:

$$\mu = \mu_{\text{máx}} \frac{[S]}{K_s + [S] + ([S]^2/K_i)}$$

Nesta equação, S é a concentração de substrato limitante, $\mu_{\text{máx}}$ é a taxa específica de crescimento máxima, K_s é a constante de saturação para o substrato e K_i é a constante de inibição (Andrews, 1968; Hill & Robinson, 1975).

A constante de saturação (K_s) corresponde à concentração do substrato para o qual a taxa específica de crescimento (μ) apresenta um valor igual a metade da taxa de crescimento máxima ($\mu_{\text{máx}}$) na ausência de inibição. Para concentrações não inibitórias de substrato, é possível estimar os valores de K_s e $\mu_{\text{máx}}$ através de métodos de linearização utilizados para a determinação das constantes cinéticas, sendo mais frequentemente

utilizados os métodos de Lineweaver-Burk, de Eadie-Hofstee e de Langmuir (Bailey & Ollis, 1986; Doran, 2000). Na representação gráfica de $1/\mu$ versus $1/[S]$, a intercepção no eixo YY' é igual a $1/\mu_{\text{máx}}$ e a ordenada na origem é igual a $-1/K_s$ (Doran, 2000).

A constante de inibição (K_i) corresponde à concentração inibitória de substrato para a qual a taxa específica de crescimento (μ) apresenta um valor igual a metade da taxa específica de crescimento máxima ($\mu_{\text{máx}}$). Para concentrações elevadas de substrato ($S \gg K_s$) a equação anterior pode ser linearizada pela representação gráfica de $1/\mu$ versus $[S]$ onde a intercepção com o eixo YY' é igual a $1/\mu_{\text{máx}}$ e o declive é igual a $1/(K_i \cdot \mu_{\text{máx}})$, recorrendo-se à representação de Dixon (Hill & Robinson, 1975; Copelland, 2000).

Para substratos inibitórios, pode utilizar-se a equação de Andrews (1968) para calcular a concentração de substrato (S_{mi}) para a qual ocorre a taxa específica de crescimento máxima ($\mu_{\text{máx}}$) na presença de substrato inibitório (Beltrame *et al.*, 1980):

$$S_{mi} = (K_s * K_i)^{0,5} \quad (\text{equação de Andrews})$$

Tendo em conta o comportamento do metalaxil como substrato inibitório efectuou-se um estudo cinético para ambos os microrganismos em que o metalaxil foi adicionado como única fonte de carbono e para um intervalo de concentrações de metalaxil mais alargado. Foram efectuados estudos sobre a cinética de crescimento dos fungos *Gongronella* sp. e *Rhizopus stolonifer* na presença de metalaxil com determinação das taxas específicas de crescimento máximas e dos valores das constantes de saturação e de inibição. A caracterização cinética do metalaxil como substrato inibitório teve como objectivo determinar a concentração máxima de metalaxil em que os fungos seleccionados o puderam utilizar como fonte de carbono e energia e o tipo de comportamento cinético observado.

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. Microrganismos

Os microrganismos utilizados nos estudos deste capítulo foram as estirpes de *Gongronella* sp. e de *Rhizopus stolonifer* isolados e seleccionados após o enriquecimento selectivo e armazenados como descrito na secção 3.2.6 do capítulo 3.

4.2.2. Fungicidas utilizados

Os fungicidas **metalaxil** (grau de pureza de 99,7%, Riedel-de Haën) e **folpete** (grau de pureza de 99,5%, Riedel-de Haën), foram utilizados como padrões para a análise e quantificação dos fungicidas por HPLC. Utilizou-se também como padrão nas análises de HPLC a ftalimida (grau de pureza de 99,7%, Riedel-de Haën) que é frequentemente formada por hidrólise do folpete em soluções aquosas.

Os mesmos fungicidas, **metalaxil** e **folpete**, previamente esterilizados em autoclave, foram utilizados nos ensaios laboratoriais em meio aquoso.

Para testar a estabilidade do metalaxil e do folpete após esterilização, foram determinadas as concentrações de soluções contendo estes fungicidas por interpolação da área de pico nas curvas de calibração respectivas e o perfil cromatográfico dessas soluções foi comparado com o perfil apresentado por soluções de metalaxil e folpete que não foram submetidos a este tratamento.

4.2.3. Preparação do inóculo

Os inóculos de cada uma das espécies fúngicas em estudo foram preparados a partir de culturas crescidas em tubo de ensaio contendo meio de PDA ou de MEA (**Anexo**

II) suplementado com fungicida comercial e com 5 dias de incubação a 28°C. A cada um dos tubos foram adicionados 2 mL de meio líquido e, após agitação num vortex, as suspensões do mesmo microrganismo foram recolhidas num tubo estéril e homogeneizadas novamente. Foram efectuadas contagens em câmara de Neubauer e o volume foi ajustado de forma a obter uma suspensão homogénea que contenha 1×10^9 esporos por mL de inóculo.

4.2.4. Estudo da degradação dos fungicidas em meio líquido

Os estudos foram efectuados para as estirpes de *Gongronella* sp. e de *R. stolonifer* em cultura pura. Para cada microrganismo, efectuaram-se estudos de degradação do metalaxil e do folpete, em separado, como única fonte de carbono, utilizando um meio de “Yeast Nitrogen Base” (YNB).

Paralelamente, efectuaram-se estudos análogos em meio de “Yeast Nitrogen Base” e glucose (10 g.L^{-1}) (YNBG). A composição de cada um dos meios de cultura utilizados está descrita no **anexo II**.

Para cada fungo e para cada meio de cultura (YNB e YNBG), estudaram-se três concentrações de metalaxil (2, 10 e 50 mg.L^{-1}) e duas de folpete (20 e 40 mg.L^{-1}) e, em simultâneo, um controlo sem fungicida. Para ambos os meios foram também efectuados estudos de degradação abiótica para cada concentração de cada um dos fungicidas em estudo. Foram ainda preparados controlos contendo a mesma quantidade de acetona, (solvente) mas sem fungicida para comparação do perfil cromatográfico.

4.2.4.1. Condições de crescimento

Para as culturas efectuadas em meio de YNBG, colocaram-se 50 mL deste meio em frascos Erlenmeyer rolhados de 250 mL e adicionaram-se as quantidades de

metalaxil ou de folpete, dissolvidas em 0,5 mL de acetona, necessárias para obter as concentrações de fungicida indicadas para cada estudo. Após evaporação do solvente, adicionaram-se 2 mL de inóculo de *Gongronella* sp. ou de *R. stolonifer* preparados de acordo com o procedimento descrito na **secção 4.2.3** e os volumes de água bidestilada estéril necessários para perfazer um volume total de 55 mL.

Para as culturas efectuadas em meio de YNB, colocaram-se 500 mL do meio em frascos Erlenmeyer rolhados de 2 L e adicionaram-se as quantidades de metalaxil ou de folpete necessárias para obter as concentrações de fungicida pretendidas, dissolvidas em 2 mL de acetona. Após evaporação do solvente, adicionaram-se 20 mL de inóculo de *Gongronella* sp. ou de *R. stolonifer* preparados de acordo com o procedimento descrito na **secção 4.2.3** e os volumes de água bidestilada estéril necessários para perfazer um volume total de 550 mL.

As amostras foram incubados por períodos de tempo regulares em incubadora orbital a 190 r.p.m. e à temperatura de 25°C.

Os estudos de quantificação do metalaxil remanescente foram efectuados durante 48 dias e as amostras foram recolhidas aos 0, 4 e 8 dias e semanalmente até aos 48 dias. Os estudos para determinação das concentrações do folpete residual e da ftalimida formada foram efectuados durante 16 dias, tendo sido recolhidas amostras aos 0, 2, 4, 8 e 16 dias.

4.2.4.2. Determinação do peso seco da biomassa

A quantificação da biomassa foi efectuada através da determinação do peso seco, por separação do micélio através de uma membrana filtrante. Foram efectuadas determinações diárias durante os primeiros 8 dias e semanalmente nas datas de quantificação dos fungicidas.

Ao tempo de incubação pretendido, os inóculos foram filtrados, sob vácuo, através de membranas de filtração estéreis (Millipore) com porosidade de 0,45 μm , previamente pesadas e calibradas a peso constante.

Após filtração, a biomassa retida na membrana foi lavada, duas vezes, com 10 mL de água destilada estéril. As membranas foram colocadas dentro de uma placa de Petri e, os conjuntos foram introduzidos numa estufa a 80°C durante 24 horas. Após secagem das amostras, os conjuntos foram colocados no excicador sob vácuo durante cerca de 6 horas e, posteriormente, foram pesados até peso constante.

O peso seco foi determinado por diferença entre o peso obtido após secagem e o peso do conjunto antes da filtração.

Para controlar a perda de peso durante o processo de secagem, passou-se um volume de água destilada estéril correspondente ao volume total do inóculo e da água de lavagem por 3 conjuntos de membranas de filtração que foram submetidos às mesmas condições de secagem que os da determinação do peso seco.

4.2.4.3. Preparação dos extractos

Após filtração sob vácuo com membranas de 0,45 μm de porosidade (Millipore), os inóculos foram submetidas à extracção, com diclorometano, em ampola de decantação. Os extractos orgânicos foram evaporados à secura, ressuspensos em 1 mL de acetonitrilo, filtrados através de membranas de 0,45 μm e guardados a -20°C para posterior análise em HPLC. Foram efectuados duplicados para cada amostra a extrair.

O método de extracção foi previamente optimizado no que respeita à escolha dos solventes e condições de extracção, tendo em conta a solubilidade dos compostos, a estabilidade dos extractos e as percentagens de recuperação.

O método utilizado permitiu extrair os compostos a dosear nas culturas com percentagens de recuperação de $96 \pm 2\%$ para o metalaxil, de $92 \pm 5\%$ para o folpete e de $93 \pm 4\%$ para a ftalimida. Os compostos permaneceram estáveis nos extractos de acetonitrilo pelo menos durante 30 dias, quando conservados à temperatura de -20°C .

4.2.4.4. Quantificação dos fungicidas

As amostras foram analisadas e quantificadas por HPLC.

O sistema de HPLC e as condições utilizadas foram as descritas na **secção 2.2.6** do **capítulo 2**, tendo-se alterado apenas a composição da fase móvel. Para análise das soluções com metalaxil utilizou-se uma fase móvel isocrática de acetonitrilo/água (40:60) com um fluxo de $0,75 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Para análise do folpete, foi utilizada uma fase móvel isocrática de acetonitrilo/água (50:50) com um fluxo de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. As leituras foram efectuadas ao comprimento de onda de 210 nm .

O metalaxil, o folpete e a ftalimida foram identificados por comparação dos valores dos respectivos tempos de retenção dos padrões correspondentes quando submetidos às mesmas condições experimentais e foram quantificados, pelo método de calibração por padrão externo, por interpolação gráfica das respectivas áreas de pico obtidas em curvas de calibração dos mesmos padrões (**Anexo III – secção B**).

O intervalo de concentrações utilizado para o metalaxil foi de $2,5$ a $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($3,6 \mu\text{M}$ a $180 \mu\text{M}$), para o folpete foi de 10 a $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($34 \mu\text{M}$ a $1350 \mu\text{M}$) e para a ftalimida foi de 10 a $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($68 \mu\text{M}$ a $2719 \mu\text{M}$). Para cada concentração foram efectuados 4 replicados para construção da curva de calibração. Para as soluções mais concentradas foram preparadas as diluições adequadas com acetonitrilo.

4.2.5. Estudos de degradação do metalaxil por biomassa obtida na fase estacionária

Para avaliar a influência da biomassa na fase estacionária sobre o processo de degradação do metalaxil efectuaram-se estudos de degradação da biomassa para cada uma das espécies de *Gongronella* sp. e de *R. stolonifer* em cultura pura obtida aos 21 dias de incubação no meio de YNBG com 10 mg.L⁻¹ de metalaxil no ensaio referido na **secção 4.2.4**. Nestes estudos, utilizou-se o metalaxil como única fonte de carbono nas concentrações de 2, 10 e 50 mg.L⁻¹

Para cada um dos microrganismos, foram também efectuados estudos com a biomassa não viável (esterilizada em autoclave a 121°C durante 20 min.) para observar se ocorreu adsorção à biomassa. A não viabilidade da biomassa autoclavada foi confirmada com culturas em MEA não se tendo observado qualquer crescimento após incubação das placas de Petri durante 5 dias a 25°C. Preparou-se também, nas mesmas condições de ensaio um controlo sem biomassa (controlo abiótico).

4.2.5.1. Condições de ensaio

Frascos Erlenmeyer rolhados de 250 mL, contendo 20 mL de solução tampão de hidrogenofosfato de sódio (KH₂PO₄ – NaOH) 0,5 M pH 7 e os volumes de uma solução aquosa de metalaxil (200 mg.L⁻¹) necessários para obter as concentrações indicadas para cada estudo, foram adicionados de 2 g de biomassa de um dos microrganismos (*Gongronella* sp. ou *R. stolonifer*), tendo o volume final sido ajustado para 25 mL com solução tampão.

O metalaxil remanescente foi quantificado às 0, 12, 24, 36 e 48 horas, tendo as amostras sido colocadas num agitador a 190 r.p.m., à temperatura de 25°C até ao momento da quantificação.

4.2.5.2. Quantificação do metalaxil

Para a quantificação do metalaxil procedeu-se previamente à filtração dos inóculos através de membranas filtrantes de 0,45 µm de porosidade (Millipore). Os filtrados foram extraídos como se descreveu na **secção 4.2.4.3**.

As amostras foram quantificadas por HPLC. O sistema de HPLC utilizado e as condições de ensaio foram as descritas na **secção 4.2.4.4** para a análise do metalaxil. O metalaxil foi quantificado pelo método de calibração por padrão externo, para o intervalo de concentrações de 2,5 a 50 mg.L⁻¹, como se descreve na **secção 4.2.4.4**. A percentagem de recuperação do metalaxil obtida nos ensaios foi de 96 ± 2%.

4.2.6. Avaliação do crescimento, em cultura pura, das estirpes de *Gongronella* sp. e *R. stolonifer* em meio aquoso com metalaxil como única fonte de carbono

Os estudos foram efectuados separadamente para a *Gongronella* sp. e para o *Rhizopus stolonifer*. Os inóculos de cada estirpe fúngica foram preparados de acordo com o procedimento descrito nas **secções 4.2.2**.

Para cada microrganismo o crescimento foi estudado em meio de YNB com o metalaxil como única fonte de carbono nas concentrações de metalaxil de 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120 e 140 mg.L⁻¹.

4.2.6.1. Condições de crescimento

As condições gerais de crescimento foram as mesmas das indicadas na **secção 4.2.4** para as culturas em YNB, nas quais apenas se fez variar as concentrações de metalaxil. Frascos Erlenmeyer rolhados de 2 L contendo 500 mL de meio de cultura YNB foram adicionados do metalaxil necessário para obter as concentrações em estudo e de

20 mL de inóculo de um dos microrganismos (preparado nas condições descritas na **secção 4.2.3**) perfazendo o volume total de 550 mL com água bidestilada estéril. Foi também preparado um controlo sem metalaxil.

As amostras foram incubados numa incubadora orbital a 190 r.p.m., à temperatura de 25°C e os estudos foram efectuados diariamente durante 16 dias.

4.2.6.2. Determinação da taxa específica de crescimento

Para a determinação das taxas específicas de crescimento de cada um dos microrganismos na presença das várias concentrações de metalaxil, efectuaram-se determinações diárias da biomassa, através da determinação do peso seco de cada uma das amostras.

O peso seco foi determinado segundo o procedimento descrito na **secção 4.2.4.2**.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Estudos de degradação do metalaxil em solução aquosa

De forma a avaliar a capacidade de degradação do metalaxil pelos microrganismos em estudo, efectuaram-se ensaios, para cada um dos fungos seleccionados, com três concentrações diferentes de metalaxil (2 mg.L⁻¹; 10 mg.L⁻¹ e 50 mg.L⁻¹), em meios contendo glucose (YNBG) e em meios sem glucose (YNB) com a quantificação do metalaxil remanescente por HPLC.

O metalaxil foi separado ao tempo de retenção de 15,2 min, por comparação com o tempo de retenção de soluções padrão de metalaxil, nas condições cromatográficas descritas (**Figura 4.1**).

As análises quantitativas do metalaxil foram efectuadas por interpolação gráfica das respectivas áreas de pico obtidas na curva de calibração do metalaxil. A equação da recta obtida foi de $y = 1\,029\,098x + 2\,411\,023$ com um valor de r^2 de 0,9996 (**Anexo III – secção B**).

Na **figura 4.1** apresentam-se, como exemplo, os cromatogramas obtidos aos 0 e aos 21 dias nas culturas de *Rhizopus stolonifer* em meio de YNB com metalaxil concentração de 10 mg.L^{-1} . Os cromatogramas obtidos nas culturas de YNBG e YNB para as estirpes *Rhizopus stolonifer* e *Gongronella* sp. nas diferentes concentrações apresentaram o mesmo perfil cromatográfico, tendo apenas variado a área do pico proporcionalmente à concentração ao metalaxil correspondente e à diluição utilizada.

Como se apresenta nesta figura, nos cromatogramas obtidos a partir das amostras contendo microrganismos, observou-se uma diminuição da área de pico do metalaxil com o tempo de incubação. No entanto, apesar de terem sido registados outros máximos de absorção, ao comprimento de onda utilizado, não foram identificados possíveis metabolitos, não se tendo observado um aumento proporcional desses picos de absorção com o desaparecimento do metalaxil.

Os valores das quantidades de metalaxil degradado aos 0, 21 e aos 42 dias de incubação pelo *Rhizopus stolonifer* e pela *Gongronella* sp., em YNB e YNBG são apresentados nas **tabelas 4.1 e 4.2**.

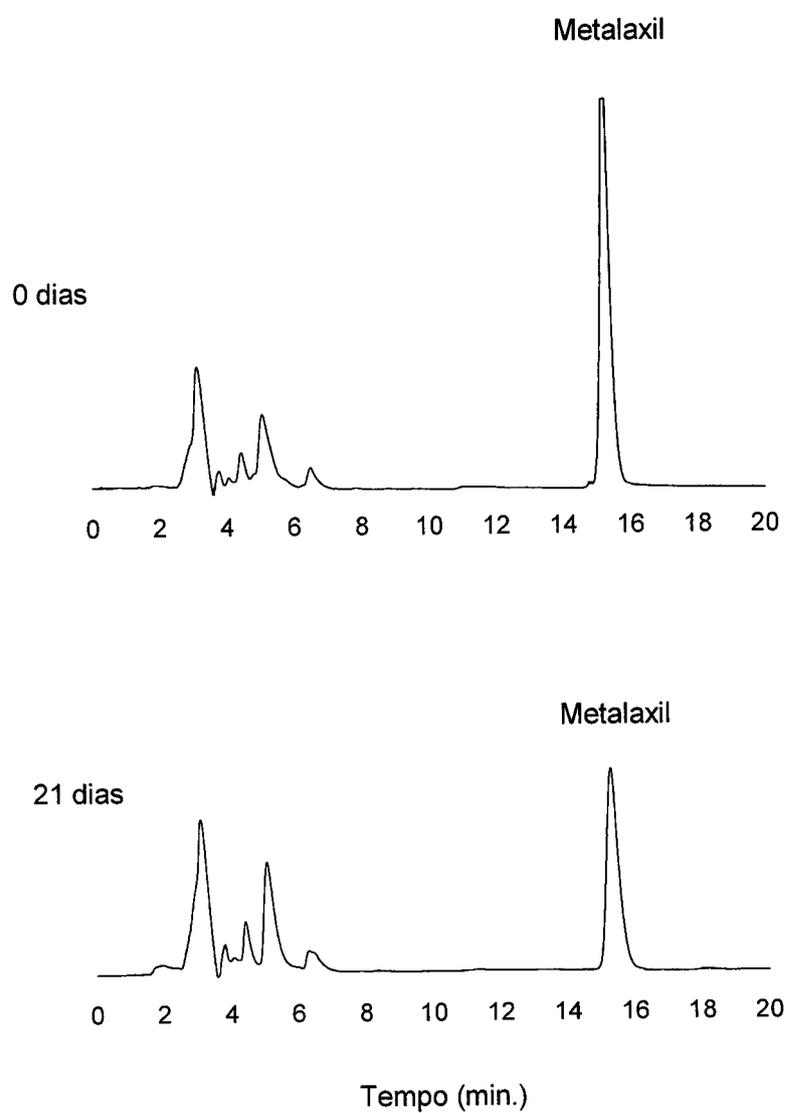


Figura 4.1 – Cromatogramas obtidos aos 0 e 21 dias para a estirpe de *Rhizopus stolonifer* em meio de YNB na presença de metalaxil na concentração de 10 mg.L⁻¹.

Tabela 4.1 - Registo da quantidade de metalaxil degradado aos 0, 21 e 42 dias de incubação nas culturas de *Gongronella* sp. e *R.stolonifer* em YNBG. Os valores representam a média de 4 replicados \pm desvio padrão.

Metalaxil adicionado		Tempo incub. (dias)	Metalaxil degradado (μ M) (YNBG)		
(mg.L ⁻¹)	(μ M)		Sem microrganismo	<i>Gongronella</i> sp.	<i>R. stolonifer</i>
2	7,19	0	0,00 \pm 0,01	0,00 \pm 0,01	0,00 \pm 0,00
		21	0,17 \pm 0,01	2,02 \pm 0,01	1,09 \pm 0,00
		42	0,25 \pm 0,01	2,50 \pm 0,02	2,50 \pm 0,02
10	35,93	0	0,01 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01
		21	0,54 \pm 0,03	12,91 \pm 0,02	7,63 \pm 0,03
		42	0,90 \pm 0,03	15,14 \pm 0,03	10,64 \pm 0,06
50	50	0	0,02 \pm 0,04	0,21 \pm 0,09	0,22 \pm 0,08
		21	2,71 \pm 0,06	29,87 \pm 0,12	17,13 \pm 0,17
		42	3,92 \pm 0,06	42,24 \pm 0,07	25,63 \pm 0,07

Tabela 4.2 - Registo da quantidade de metalaxil degradado aos 0, 21 e 42 dias de incubação nas culturas de *Gongronella* sp. e *R.stolonifer* em YNB. Os valores representam a média de 4 replicados \pm desvio padrão.

Metalaxil adicionado		Tempo incub. (dias)	Metalaxil degradado (μ M) (YNB)		
(mg.L ⁻¹)	(μ M)		Sem microrganismo	<i>Gongronella</i> sp.	<i>R. stolonifer</i>
2	7,19	0	0,00 \pm 0,01	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,01
		21	0,18 \pm 0,01	1,45 \pm 0,01	1,26 \pm 0,01
		42	0,25 \pm 0,02	2,11 \pm 0,01	1,68 \pm 0,07
10	35,93	0	0,01 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01
		21	0,47 \pm 0,02	9,10 \pm 0,02	7,94 \pm 0,02
		42	0,86 \pm 0,03	13,35 \pm 0,06	9,91 \pm 0,05
50	50	0	0,02 \pm 0,03	0,21 \pm 0,09	0,21 \pm 0,09
		21	2,68 \pm 0,04	27,3 \pm 0,03	19,59 \pm 0,07
		42	3,87 \pm 0,05	40,1 \pm 0,05	24,01 \pm 0,18

Nos ensaios efectuados em YNB e YNBG na ausência de microrganismos, os valores de metalaxil degradado foram muito baixos relativamente aos obtidos na presença de um dos microrganismos seleccionados, tendo-se observado valores de metalaxil remanescente superiores a 96% aos 42 dias de ensaio, em ambos os meios aquosos e para as diferentes concentrações estudadas.

Para avaliar o comportamento das culturas de *Gongronella* sp. e *R. stolonifer* em presença de diferentes concentrações (2, 10 e 50 mg.L⁻¹), na degradação do metalaxil ao longo do tempo de incubação, nas **figuras 4.2 e 4.3** apresentam-se os perfis de degradação do metalaxil obtidos durante os 42 dias de ensaio nos meios de YNBG e de YNB, respectivamente.

Como se observa nestas figuras, os perfis de degradação apresentaram uma relação linear ($r > 0,998$) entre o metalaxil degradado (%) e o tempo até aos 21 dias de ensaio para as 3 concentrações e para ambos os microrganismos, a partir deste período observou-se uma diminuição da quantidade degradada por dia, embora os microrganismos tenham continuado a degradar o composto até aos 42 dias.

Nos estudos efectuados em meio YNBG (**tabela 4.1 e figura 4.2**), a degradação observada aos 21 dias para a *Gongronella* sp. e para o *Rhizopus stolonifer* foi, respectivamente de 28% e 15% para a concentração inicial de 2 mg.L⁻¹, de 36% e 21% para a concentração de 10 mg.L⁻¹ e de 17% e 10% para a concentração de metalaxil de 50 mg.L⁻¹.

Aos 42 dias, em YNBG, a percentagem de metalaxil degradado para a *Gongronella* sp. e para o *R. stolonifer* foi, respectivamente de 35% e de 23% para a concentração de 2 mg.L⁻¹, de 42% e 30% para a concentração de 10 mg.L⁻¹ e de 23% e 14% para a concentração de metalaxil de 50 mg.L⁻¹.

Nos estudos em que o metalaxil foi utilizado como única fonte de carbono (YNB) (**tabela 4.2 e figura 4.3**), a degradação observada aos 21 dias foi de 20% para a *Gongronella* sp. e de 18% para o *R. stolonifer* para a concentração de 2 mg.L⁻¹; de 25% para a *Gongronella* sp. e de 22% para o *R. stolonifer* para a concentração de 10 mg.L⁻¹ e de 15% para a *Gongronella* sp. e de 11% para *R. stolonifer* para a concentração de 50 mg.L⁻¹ de metalaxil.

Aos 42 dias, em YNB, a percentagem de metalaxil degradado foi de 29% para a *Gongronella* sp. e de 23% para o *R. stolonifer* para a concentração inicial de metalaxil de 2 mg.L⁻¹, de 37% para a *Gongronella* sp. e de 28% para o *R. stolonifer* para a concentração de 10 mg.L⁻¹ e de 22% para a *Gongronella* sp. e de 13% para o *R. stolonifer* para a concentração de 50 mg.L⁻¹ de metalaxil.

Os valores de biomassa (mg.L⁻¹) obtidos para as culturas de *Gongronella* sp. e *Rhizopus stolonifer* nos meios YNBG e YNB ao longo do tempo estão apresentados nas **figuras 4.4 e 4.5**, respectivamente.

As curvas de crescimento das estirpes em estudo apresentaram um crescimento exponencial apenas durante os primeiros 7 dias de crescimento quer na presença de glucose (meio de YNBG) quer na presença de metalaxil como única fonte de carbono (meio de YNB), para as três concentrações de fungicida estudadas 2, 10 e 50 mg.L⁻¹.

Nas culturas em YNBG, no final da fase exponencial, a concentração de biomassa obtida foi de 3,5 g.L⁻¹ para a *Gongronella* sp. e de 2,6 g.L⁻¹ para o *Rhizopus stolonifer* na ausência de metalaxil. Na presença das concentrações iniciais de metalaxil de 2 mg.L⁻¹, 10 mg.L⁻¹ e 50 mg.L⁻¹, a concentração de biomassa obtida foi, respectivamente de 4,0, 4,7 e 2,6 g.L⁻¹ para a *Gongronella* sp. e de 2,9, 3,4 e 2,0 g.L⁻¹ para o *R. stolonifer*, tendo-se observado uma diminuição da biomassa produzida para a concentração de 50 mg.L⁻¹, parecendo indicar um certo efeito inibitório na degradação do metalaxil (**Figura 4.4**).

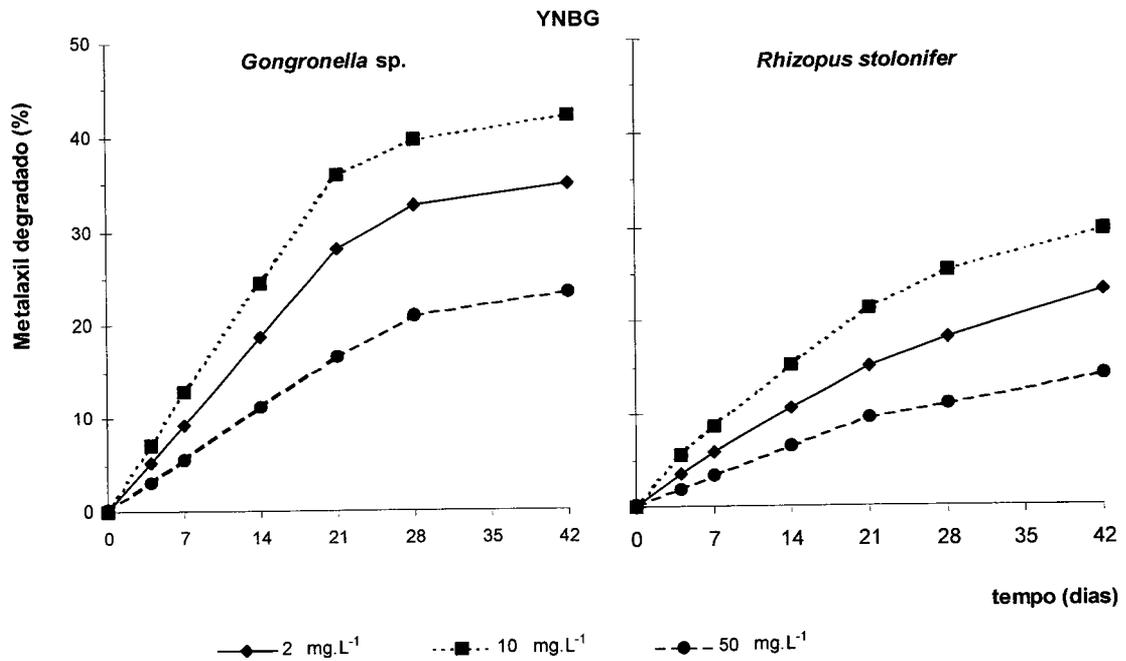


Figura 4.2 – Registo das percentagens de metalaxil degradado pelas estirpes de *Gongronella sp* e *R stolonifer* em meio de YNBG. Cada ponto representa a média de 4 replicados.

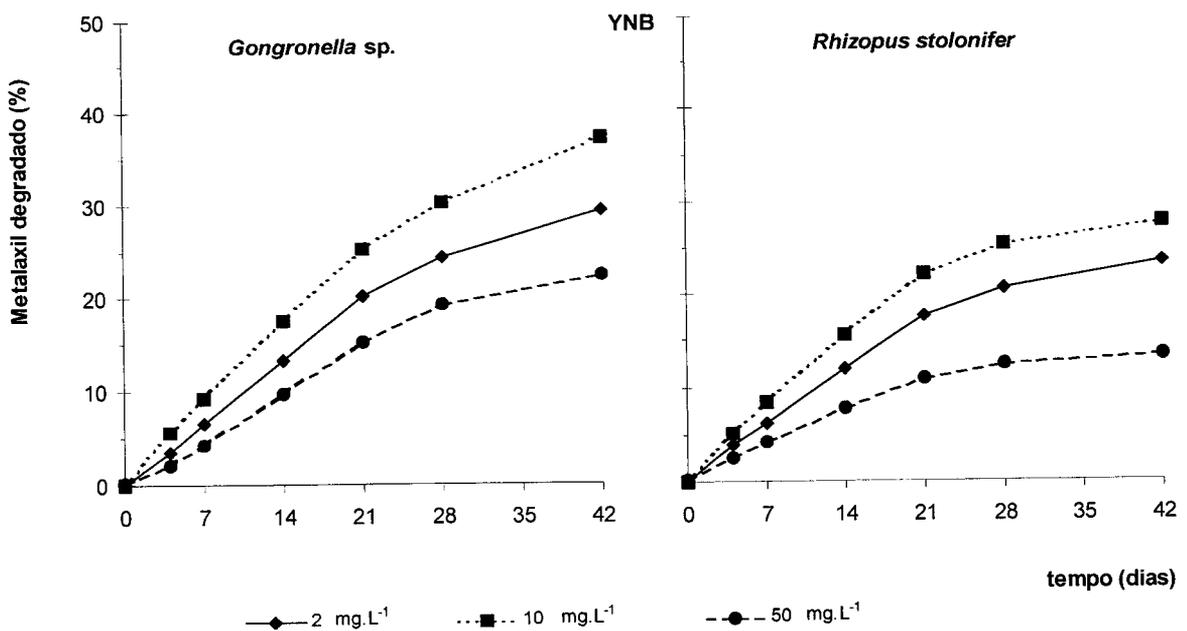


Figura 4.3 – Registo das percentagens de metalaxil degradado pelas estirpes de *Gongronella sp.* e *R stolonifer* em meio de YNB. Cada ponto representa a média de 4 replicados

O perfil de crescimento observado para a *Gongronella* sp. e para o *Rhizopus stolonifer* nas culturas de YNB foi semelhante ao observado nos ensaios em YNBG embora a quantidade de biomassa produzida nos ensaios efectuados na presença de metalaxil como fonte de carbono seja bastante inferior (**Figura 4.5**). No entanto, nos ensaios efectuados em YNB a fonte de carbono disponível para os microrganismos (metalaxil) foi muito baixa relativamente à utilizada no meio YNBG onde também foi adicionado glucose (10 mg.L^{-1}). Nestes estudos, utilizaram-se concentrações relativamente baixas de metalaxil porque, apesar deste composto poder ser utilizado como substrato pelos fungos seleccionados, em concentrações elevadas pode tornar-se tóxico e também porque é importante estudar o comportamento dos microrganismos na presença de concentrações de metalaxil aproximadas às concentrações que é possível encontrar no ambiente.

Nos ensaios em que o metalaxil foi aplicado como única fonte de carbono, no final da fase exponencial de crescimento, a biomassa obtida variou entre $0,79$ e $1,18 \text{ mg.L}^{-1}$ para a *Gongronella* sp. e entre $0,63$ e $0,91 \text{ mg.L}^{-1}$ para o *Rhizopus stolonifer*, tendo-se observado um aumento da produção de biomassa com o aumento da concentração de metalaxil até 10 mg.L^{-1} . Para a concentração de 50 mg.L^{-1} observou-se uma diminuição da biomassa, parecendo existir um certo efeito inibitório do metalaxil sobre o crescimento dos microrganismos como também se observou nas culturas de YNBG. O aumento da biomassa nos ensaios efectuados com meio YNB sem metalaxil foi nula (**Figura 4.5**).

Nos ensaios efectuados, observou-se que após o crescimento exponencial, a biomassa continuou a influenciar o processo de degradação do metalaxil, pelo menos até aos 42 dias (**figuras 4.2 – 4.5**). Mesmo quando não estavam a utilizar o metalaxil para produção de biomassa, as espécies *Gongronella* e *R. stolonifer* continuaram a degradar o metalaxil utilizando, possivelmente, um processo de metabolismo secundário para a manutenção celular.

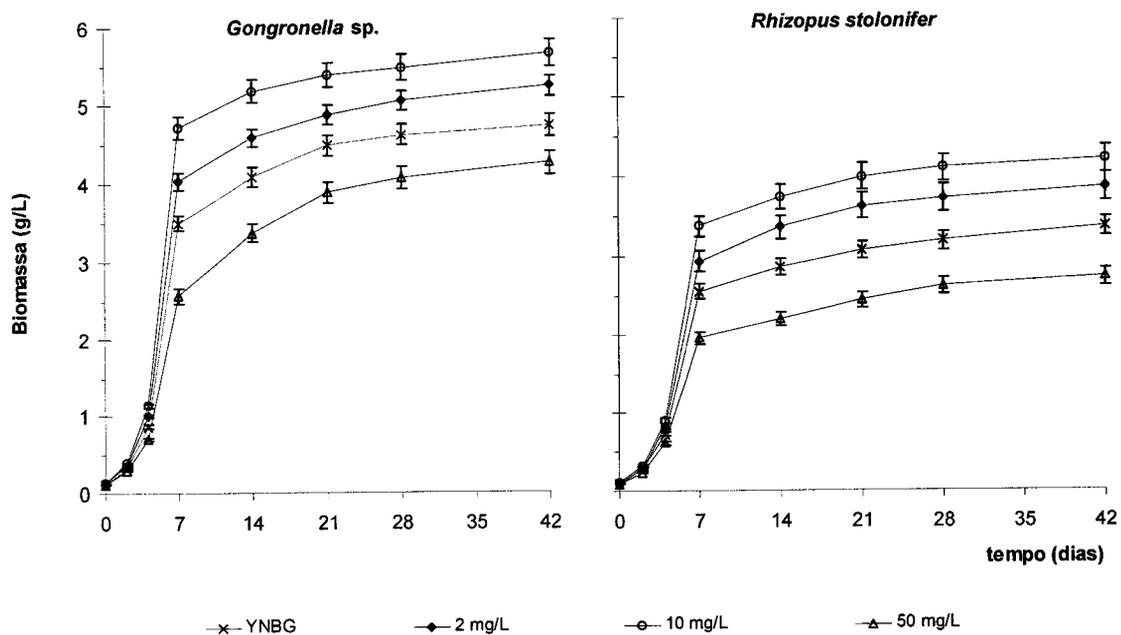


Figura 4.4 – Curvas de crescimento dos microrganismos seleccionados obtidas nas culturas em meio de YNBG com metalaxil. Cada ponto representa a média de 4 replicados ± o desvio padrão.

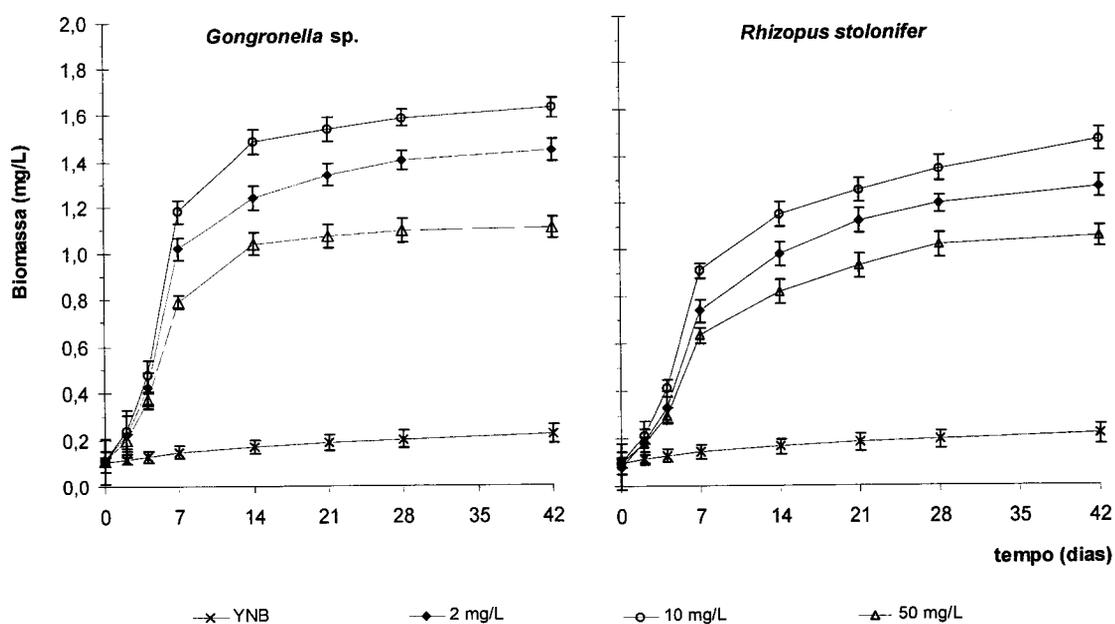


Figura 4.5 - Curvas de crescimento dos microrganismos seleccionados obtidas nas culturas em meio de YNB com metalaxil. Cada ponto representa a média de 4 replicados ± o desvio padrão.

Para o estudo do perfil de aumento da biomassa em relação ao perfil de degradação do metalaxil escolheram-se os ensaios efectuados em meio de YNB de modo a melhor evidenciar o comportamento deste composto como única fonte de carbono (**Figuras 4.6 e 4.7**).

O perfil da representação gráfica do aumento da biomassa e da taxa de degradação versus tempo para cada um dos microrganismos é semelhante para as três concentrações estudadas (**Figuras 4.6 e 4.7**). Numa primeira fase (até aos 7 dias) observou-se um crescimento exponencial da biomassa com degradação do metalaxil. Numa segunda fase (entre 7 e 21 dias) observou-se um crescimento mais lento possivelmente devido à limitação de um nutriente, muito provavelmente o oxigénio dissolvido, embora exista ainda uma correlação entre a percentagem de metalaxil remanescente e o tempo, podendo este estar a ser utilizado num processo de metabolismo secundário, provavelmente como substrato de manutenção. Numa terceira fase (a partir dos 21 dias), os microrganismos começaram a eliminar muito mais lentamente o metalaxil, provavelmente por diminuição da biomassa activa presente.

Como se observou uma proporcionalidade directa entre a quantidade de metalaxil degradado ao longo do tempo para os primeiros 21 dias de ensaio (**figuras 4.2 e 4.3**) procedeu-se ao cálculo das taxas de degradação do fungicida pelas espécies em estudo para este intervalo de tempo.

As taxas de degradação do metalaxil para as três concentrações estudadas e as taxas específicas de crescimento obtidas para as estirpes de *Gongronella* sp. e *Rhizopus stolonifer*, nas culturas de YNB e YNBG são apresentadas nas **tabelas 4.3 e 4.4**.

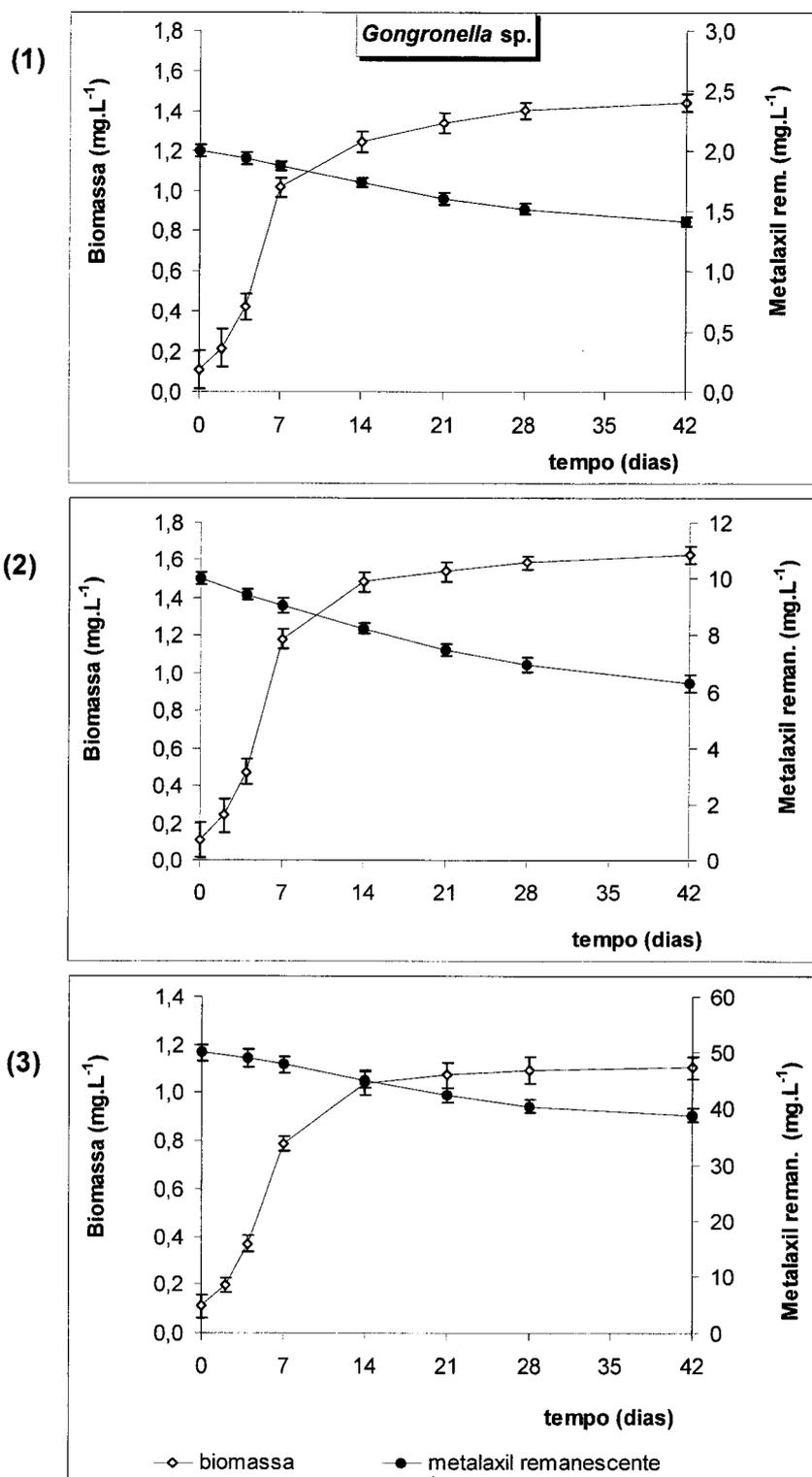


Figura 4.6 – Perfis do aumento da biomassa de *Gongronella sp.* e da degradação do metalaxil em YNB para as diferentes concentrações estudadas: (1): 2 mg.L⁻¹; (2): 10 mg.L⁻¹ e (3): 50 mg.L⁻¹. Os resultados representam a média de 4 replicados ± o desvio padrão.

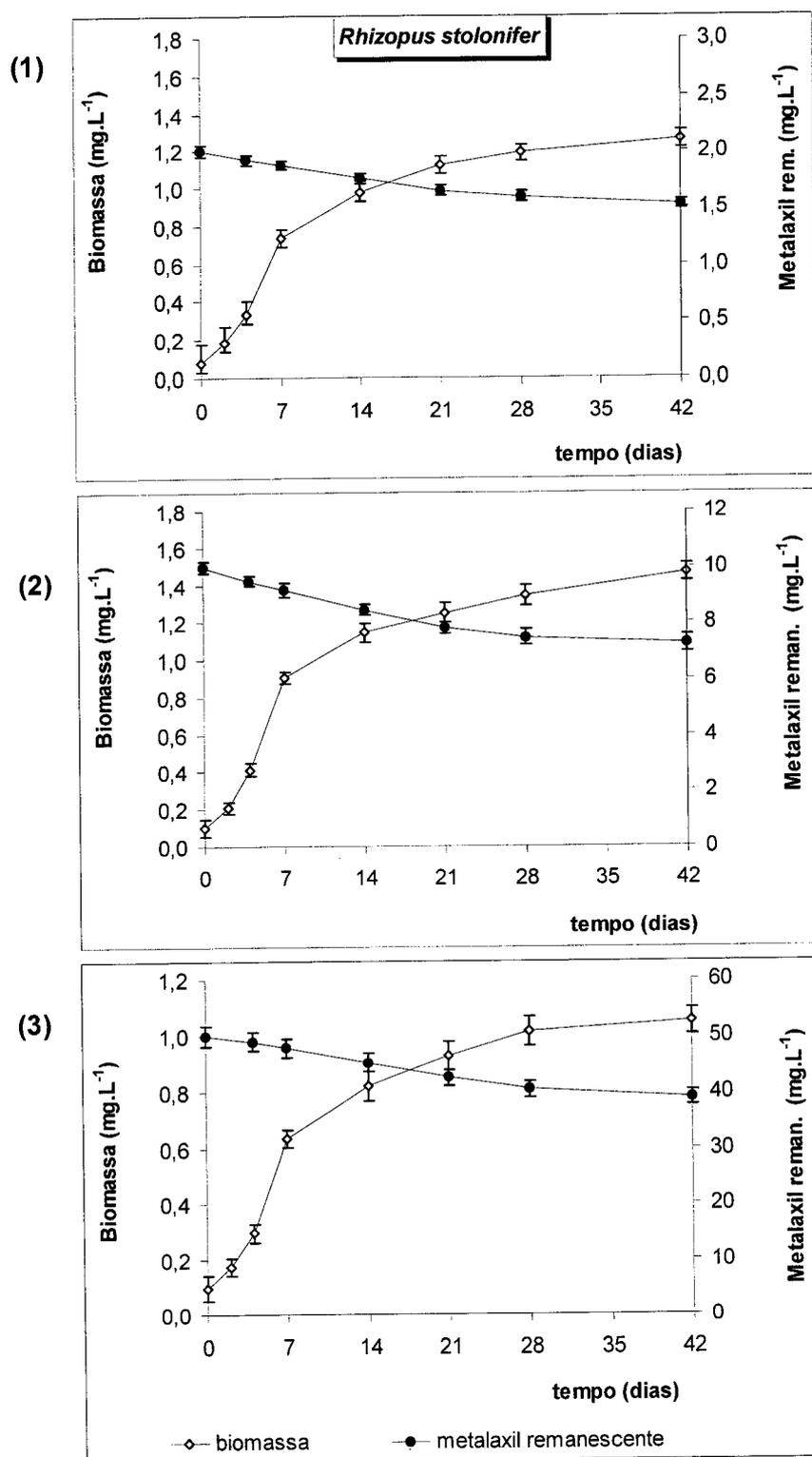


Figura 4.7 - Perfil do aumento da biomassa de *Rhizopus stolonifer* e da degradação do metalaxil em YNB para as diferentes concentrações estudadas: (1): 2 mg.L⁻¹; (2): 10 mg.L⁻¹ e (3): 50 mg.L⁻¹. Os resultados representam a média de 4 replicados ± o desvio padrão.

Tabela 4.3 - Registo dos valores médios das taxas de degradação de metalaxil ($\mu\text{M}\cdot\text{dia}^{-1}$) e das taxas de específicas de crescimento μ para as estirpes seleccionadas em **YNBG**. Os valores representam a média de 4 replicados \pm desvio padrão.

Meio de Cultura	[Metalaxil] ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) (μM)		Estirpes fúngicas	Taxas de degradação ($\mu\text{M}\cdot\text{dia}^{-1}$)	Taxas específicas de crescimento μ (h^{-1})
YNBG	2	7,19	<i>Gongronella</i> sp.	$0,0964 \pm 0,0002$	$0,0210 \pm 0,0001$
			<i>R. stolonifer</i>	$0,0515 \pm 0,0002$	$0,0204 \pm 0,0002$
	10	35,93	<i>Gongronella</i> sp.	$0,6132 \pm 0,0012$	$0,0221 \pm 0,0002$
			<i>R. stolonifer</i>	$0,3555 \pm 0,0011$	$0,0208 \pm 0,0002$
	50	179,64	<i>Gongronella</i> sp.	$1,423 \pm 0,014$	$0,0187 \pm 0,0002$
			<i>R. stolonifer</i>	$0,8088 \pm 0,013$	$0,0182 \pm 0,0004$

Tabela 4.4 - Registo dos valores médios das taxas de degradação de metalaxil ($\mu\text{M}\cdot\text{dia}^{-1}$) e das taxas de específicas de crescimento μ para as estirpes seleccionadas em **YNB**. Os valores representam a média de 4 replicados \pm desvio padrão.

Meio de Cultura	[Metalaxil] ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) (μM)		Estirpes fúngicas	Taxas de degradação ($\mu\text{M}\cdot\text{dia}^{-1}$)	Taxas específicas de crescimento μ (h^{-1})
YNB	2	7,19	<i>Gongronella</i> sp.	$0,0693 \pm 0,0004$	$0,0134 \pm 0,0004$
			<i>R. stolonifer</i>	$0,0600 \pm 0,0012$	$0,0126 \pm 0,0003$
	10	35,93	<i>Gongronella</i> sp.	$0,4288 \pm 0,0016$	$0,0141 \pm 0,0004$
			<i>R. stolonifer</i>	$0,3738 \pm 0,0006$	$0,0132 \pm 0,0003$
	50	179,64	<i>Gongronella</i> sp.	$1,320 \pm 0,009$	$0,0120 \pm 0,0004$
			<i>R. stolonifer</i>	$0,9194 \pm 0,0069$	$0,0110 \pm 0,0001$

Como se apresenta na **tabela 4.3**, nas culturas de YNBG, as taxas de degradação do metalaxil variaram entre 0,1 e 1,4 $\mu\text{M}\cdot\text{dia}^{-1}$ para a espécie *Gongronella* sp. e entre 0,05 e 0,8 $\mu\text{M}\cdot\text{dia}^{-1}$ para o *Rhizopus stolonifer*. As taxas específicas de crescimento da *Gongronella* sp. variaram de 0,019 a 0,022 h^{-1} e as de *R. stolonifer* variaram de 0,018 a 0,021 h^{-1} , diminuindo para a maior concentração de metalaxil estudada (50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

Como se apresenta na **tabela 4.4**, nas culturas de YNB, as taxas de degradação do metalaxil oscilaram entre 0,07 e 1,32 $\mu\text{M}\cdot\text{dia}^{-1}$ para a espécie *Gongronella* sp. e entre 0,06 e 0,91 $\mu\text{M}\cdot\text{dia}^{-1}$ para o *Rhizopus stolonifer*. As taxas específicas de crescimento foram de 0,012 a 0,014 h^{-1} para a estirpe de *Gongronella* sp. e de 0,011 a 0,013 h^{-1} para a estirpe de *Rhizopus stolonifer*, tendo-se observado uma diminuição na presença da concentração mais elevada de metalaxil em estudo (50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

Nestes estudos, na presença de cada um dos fungos seleccionados, observou-se um aumento das taxas de degradação do metalaxil com o aumento da concentração de metalaxil presente em solução. No entanto, para a concentração de 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, embora tenha havido um aumento da taxa de degradação do metalaxil, observou-se uma diminuição das taxas específicas de crescimento.

4.3.2. Estudos de degradação do folpete em solução aquosa

De forma a determinar a capacidade de degradação do folpete pelos microrganismos em estudo efectuaram-se estudos em meios contendo glucose (YNBG) e folpete e em meios de YNB contendo o folpete como única fonte de carbono, com a quantificação do folpete remanescente por HPLC.

Como já referimos anteriormente, a ftalimida é um dos principais produtos resultantes da degradação do folpete, tendo também sido quantificada. Nas condições cromatográficas descritas na **secção 4.2.4.4**, a ftalimida e o folpete foram separados, respectivamente, aos tempos de retenção de 3,3 min e de 16,0 min, por comparação com os tempos de retenção de soluções padrão de ftalimida e folpete.

As análises quantitativas do folpete e da ftalimida foram efectuadas por interpolação gráfica das respectivas áreas de pico obtidas nas respectivas curvas de calibração. Na curva de calibração do folpete a equação obtida foi de $y = 131\,668x + 297\,689$ com um valor de r^2 de 0,9997. Na curva de calibração da ftalimida a equação obtida foi de $y = 26\,140x + 729\,917$ com um valor de r^2 de 0,9997 (**Anexo III – secção B**).

Na **figura 4.8** apresenta-se, como exemplo, um dos cromatogramas obtidos aos 0 e 16 dias no estudo efectuado em meio de YNB contendo folpete na concentração de 20 mg.L⁻¹, na presença de *Rhizopus stolonifer*.

Os cromatogramas obtidos na presença de 40 mg.L⁻¹ de folpete concentração em estudo têm o mesmo perfil cromatográfico, tendo-se apenas utilizado uma diluição superior. Os cromatogramas obtidos para a *Gongronella* sp. para as duas concentrações em estudo e os obtidos para o controlo efectuado sem microrganismo (controlo de degradação abiótica) também apresentaram o mesmo perfil cromatográfico, diferindo apenas nas áreas dos picos de ftalimida e folpete, proporcionalmente à concentração em estudo.

Os cromatogramas obtidos no estudo de degradação abiótica também apresentaram um perfil idêntico, no entanto, a quantidade de folpete obtida aos 16 dias foi superior, como se pode observar na **figura 4.9**.

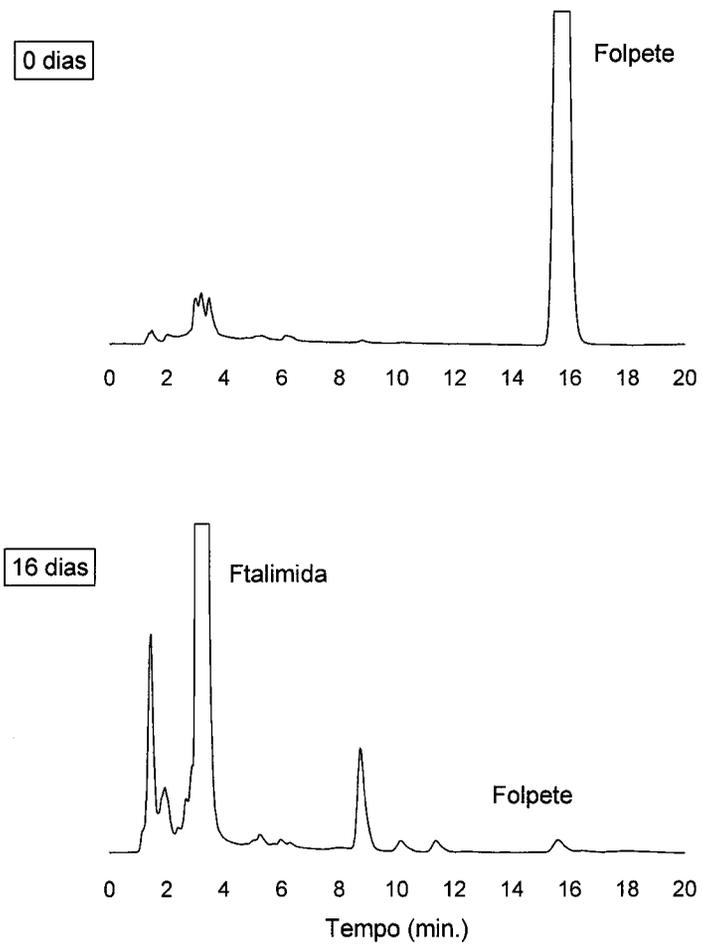


Figura 4.8– Cromatogramas obtidos aos 0 e 16 dias para as culturas de *R. stolonifer* em meio de YNB na presença de folpete na concentração de 20 mg.L⁻¹.

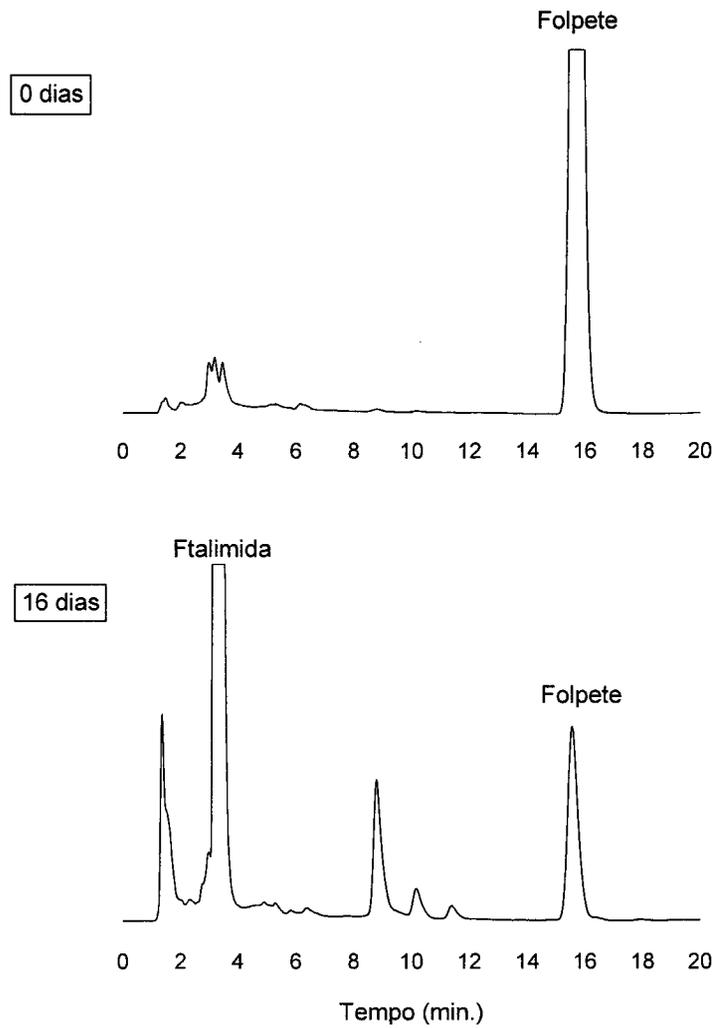


Figura 4.9 - Cromatogramas obtidos aos 0 e 16 dias na ausência de microrganismos no meio de YNB contendo folpete na concentração de 20 mg.L⁻¹.

Como indicam os exemplos apresentados nas **figuras 4.8 e 4.9**, nos cromatogramas obtidos, observou-se uma diminuição da área de pico do folpete com o tempo de incubação e a ftalimida foi o produto majoritário formado por degradação do folpete, quer na ausência, quer na presença dos microrganismos.

Os valores das quantidades de folpete degradado e de ftalimida formada aos 0, 8 e 16 dias de incubação nas culturas de YNB e YNBG, pelas estirpes *Rhizopus stolonifer* e *Gongronella* sp., são apresentados, respectivamente, nas **tabelas 4.5 e 4.6**.

Tabela 4.5- Registo da quantidade de folpete degradado nas culturas de *Gongronella* sp. e *R. stolonifer*. Os valores representam a média de 4 replicados \pm desvio padrão.

Meio de cultura	[folpete] _{inicial}		Tempo (dias)	Folpete degradado (μ M)		
	(mg.L ⁻¹)	(μ M)		Sem microrganismos	<i>Gongronella</i> sp.	<i>R. stolonifer</i>
YNBG	20	67,44	0	0,04 \pm 0,01	0,06 \pm 0,03	0,04 \pm 0,02
			8	28,02 \pm 0,13	58,32 \pm 0,34	53,97 \pm 0,24
			16	32,26 \pm 0,21	65,96 \pm 0,31	63,97 \pm 0,16
	40	134,9	0	0,06 \pm 0,01	0,04 \pm 0,02	0,02 \pm 0,03
			8	63,14 \pm 0,33	115,07 \pm 0,24	104,38 \pm 0,27
			16	75,69 \pm 0,27	127,45 \pm 0,15	122,72 \pm 0,17
YNB	20	67,44	0	0,05 \pm 0,04	0,09 \pm 0,05	0,11 \pm 0,06
			8	27,56 \pm 0,29	56,00 \pm 0,29	50,38 \pm 0,17
			16	32,22 \pm 0,27	63,58 \pm 0,32	60,19 \pm 0,25
	40	134,9	0	0,08 \pm 0,04	0,21 \pm 0,09	0,21 \pm 0,09
			8	62,36 \pm 0,30	109,82 \pm 0,31	96,98 \pm 0,32
			16	75,74 \pm 0,32	121,85 \pm 0,15	113,18 \pm 0,26

Tabela 4.6- Registo da quantidade de ftalimida formada nas culturas de *Gongronella* sp. e *R. stolonifer*. Os valores representam a média de 4 replicados \pm desvio padrão.

Meio de cultura	[folpete] inicial		Tempo (dias)	Ftalimida formada (μ M)		
	(mg.L ⁻¹)	(μ M)		Sem microrganismos	<i>Gongronella</i> sp.	<i>R. stolonifer</i>
YNBG	20		0	0,00 \pm 0,01	0,00 \pm 0,01	0,00 \pm 0,00
			8	25,67 \pm 0,31	29,58 \pm 0,01	28,16 \pm 0,00
			16	28,85 \pm 0,15	33,40 \pm 0,02	31,61 \pm 0,02
	40	134,9	0	0,01 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01
			8	42,42 \pm 0,24	47,57 \pm 0,02	47,88 \pm 0,02
			16	49,32 \pm 0,13	55,63 \pm 0,03	55,09 \pm 0,03
YNB	20	67,44	0	0,02 \pm 0,04	0,21 \pm 0,09	0,21 \pm 0,09
			8	25,28 \pm 0,24	29,80 \pm 0,12	28,23 \pm 0,17
			16	28,89 \pm 0,21	33,20 \pm 0,07	31,63 \pm 0,07
	40	134,9	0	0,02 \pm 0,04	0,21 \pm 0,09	0,21 \pm 0,07
			8	42,73 \pm 0,16	48,01 \pm 0,12	46,48 \pm 0,07
			16	49,27 \pm 0,12	55,21 \pm 0,07	53,33 \pm 0,07

Para avaliar o comportamento das culturas de *Gongronella* sp. e *R. stolonifer* em presença de duas concentrações (20 e 40 mg.L⁻¹), na degradação do folpete ao longo do tempo de incubação, na **figuras 4.10** apresentam-se os perfis de degradação do folpete obtidos durante os 16 dias de ensaio nos meios de YNBG e de YNB, respectivamente.

Como se observa nestas figuras, os perfis de degradação apresentaram uma relação linear ($r > 0,998$) entre o folpete degradado (%) e o tempo até aos 16 dias de ensaio para as 3 concentrações e para ambos os microrganismos.

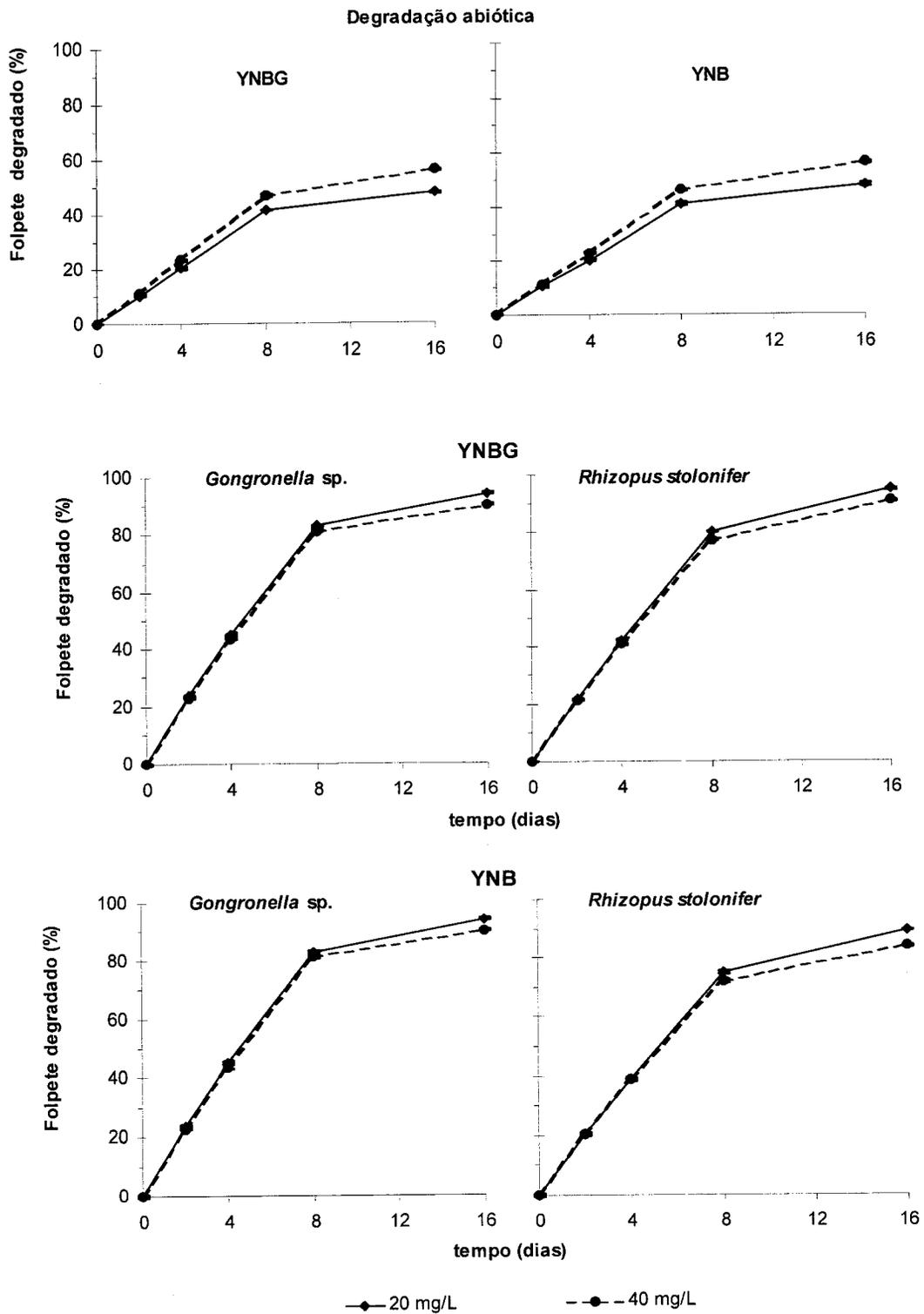


Figura 4.10 – Registo das percentagens de folpete degradado na ausência e na presença dos microrganismos seleccionados nos meio de YNBG e de YNB. Cada ponto representa a média de 4 replicados.

Nos estudos efectuados em meio de YNBG (tabela 4.5 e figura 4.10), a degradação observada aos 8 dias na presença de *Gongronella* sp. e de *R. stolonifer* foi, respectivamente, de 86% e 80% para a concentração de 20 mg.L⁻¹ e de 85% e 77% para a concentração de 40 mg.L⁻¹. Aos 16 dias, a percentagem de folpete degradado nas culturas de *Gongronella* sp. e de *R. stolonifer* foi, respectivamente, de 98% e de 95% para a concentração de 20 mg.L⁻¹ e de 95% e 91% para a concentração de 40 mg.L⁻¹.

Nos ensaios sem microrganismos, observou-se uma degradação do folpete de cerca de 42% e de 47% aos 8 dias e de cerca de 48% e de 56% aos 16 dias para as concentrações de folpete iniciais de 20 mg.L⁻¹ e 40 mg.L⁻¹, respectivamente.

Nos estudos em que o folpete foi utilizado como única fonte de carbono (YNB) (tabela 4.5 e figura 4.10), a degradação observada aos 8 dias na presença de *Gongronella* sp. e de *R. stolonifer* foi, respectivamente, de 83% e 75% para a concentração de 20 mg.L⁻¹ e de 81% e 72% para a concentração de 40 mg.L⁻¹ de folpete. Aos 16 dias, a percentagem de folpete degradado nas culturas de *Gongronella* sp. e de *R. stolonifer* foi, respectivamente de 94% e de 89% para a concentração de 20 mg.L⁻¹, de 80% e 84% para a concentração de metalaxil de 40 mg.L⁻¹.

Nos ensaios sem microrganismos, observou-se uma degradação do folpete de cerca de 41% e de 46% aos 8 dias e de cerca de 48% e de 56% aos 16 dias para as concentrações de folpete iniciais de 20 mg.L⁻¹ e 40 mg.L⁻¹, respectivamente.

Na figura 4.11 apresentam-se os valores de ftalimida formada (%) durante os 16 dias de ensaio efectuados nos meios de YNBG e YNB, na ausência de microrganismos e na presença de *Gongronella* sp. e de *Rhizopus stolonifer*.



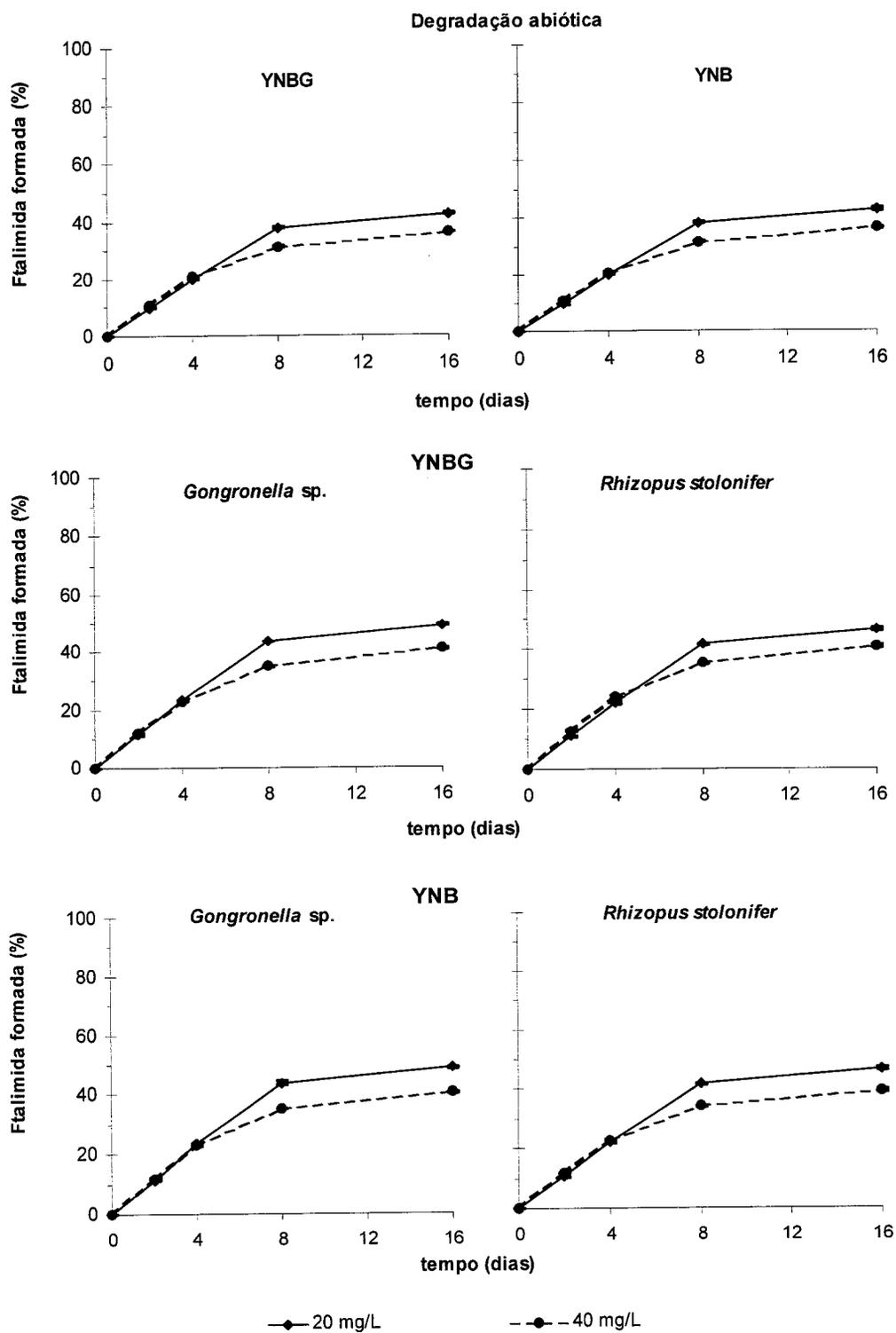


Figura 4.11– Registo das percentagens de fthalimida formada na ausência e na presença dos microrganismos seleccionados em meio de YNBG e de YNB. Cada ponto representa a média de 4 replicados.

Neste estudo, observou-se que a percentagem de ftalimida formada em cada uma das culturas de *Gongronella* sp. e *Rhizopus stolonifer*, foi idêntica nos meios de YNB e de YNBG (tabela 4.6 e figura 4.11). Também não se observou uma relação de proporcionalidade directa entre a quantidade de folpete degradado por acção dos fungos em estudo e a quantidade de ftalimida formada, tendo-se obtido quantidades de ftalimida formada semelhantes, para cada uma das concentrações de folpete iniciais, nos ensaios de degradação abiótica e nos ensaios realizados na presença dos microrganismos.

Aos 8 dias, a percentagem de ftalimida formada nas culturas de *Gongronella* sp. e de *Rhizopus stolonifer* foi, respectivamente, de 44% e de 42% para a concentração de folpete de 20 mg.L⁻¹ e de 36% e 35% para a concentração de 40 mg.L⁻¹. Aos 16 dias a percentagem de ftalimida formada nas culturas de *Gongronella* sp. e de *R. stolonifer* foi, respectivamente, de 49% e de 46% para a concentração de 20 mg.L⁻¹ e de 41% e 39% para a concentração de 40 mg.L⁻¹. Nas ausência de microrganismos, a ftalimida formada aos 8 dias foi de 38% e de 31% nas soluções com 20 mg.L⁻¹ e de 40 mg.L⁻¹ de folpete e aos 16 dias foi, respectivamente de 43% e 36%.

Os valores de biomassa (mg.L⁻¹) obtidos para as culturas de *Gongronella* sp. e *Rhizopus stolonifer* nos meios YNBG e YNB ao longo do tempo do tempo são apresentados na figura 4.12.

As estirpes em estudo, apresentaram um crescimento exponencial apenas nos primeiros 8 dias de crescimento quer na presença de glucose (meio de YNBG) quer na presença de folpete como única fonte de carbono (meio de YNB), para as duas concentrações de fungicida estudadas: 20 e 40 mg.L⁻¹

No meio de YNBG, no final da fase exponencial, na ausência de folpete, a biomassa obtida foi de 4,5 mg.L⁻¹ para a *Gongronella* sp. e de 3,0 mg.L⁻¹ para o *R. stolonifer*. Na presença de folpete a concentração de biomassa obtida variou entre 4,0 e

3,2 mg.L⁻¹ para a *Gongronella* sp. e entre 2,2 e 1,7 mg.L⁻¹ para o *R. stolonifer*, tendo-se verificado uma diminuição da biomassa produzida na presença de folpete, parecendo indicar um efeito inibitório.

No entanto, as curvas de crescimento obtidas em culturas de *Gongronella* sp. e de *R. stolonifer* em meio de YNB mostraram que estes microrganismos também conseguem utilizar o folpete para a produção de biomassa, embora tenham sido obtidos valores de biomassa muito pequenos e que diminuem com a concentração de folpete presente.

Os valores médios de biomassa obtidos, no final da fase exponencial, em meio de YNB com folpete nas concentrações de 20 e de 40 mg.L⁻¹ foram, respectivamente, de 0,66 e 0,44 mg.L⁻¹ para a *Gongronella* sp. e de 0,53 e 0,36 mg.L⁻¹ para o *R. stolonifer* (**Figura 4.12**).

De modo a melhor evidenciar o comportamento do folpete como única fonte de carbono estão apresentados nas **figuras 4.13 e 4.14** as representações gráficas do perfil de crescimento da biomassa em relação ao perfil de degradação do folpete obtidos nos ensaios em YNB para a *Gongronella* sp. e para o *Rhizopus stolonifer*. Como os valores de degradação abiótica foram significativos, nos gráficos apresentados foram subtraídos os valores correspondentes à degradação abiótica, com o objectivo de avaliar a degradação devida à presença de cada um dos fungos em estudo.

O perfil das representações gráficas do crescimento da biomassa e da degradação do folpete foi semelhante para os dois microrganismos e para as duas concentrações em estudo, embora o folpete na concentração de 40 mg.L⁻¹ pareça exercer um certo efeito inibitório sob o crescimento da biomassa (**Figuras 4.13 e 4.14**). Nestes gráficos observou-se que a fase exponencial de crescimento foi muito próxima da fase linear de degradação do folpete com o tempo de ensaio.

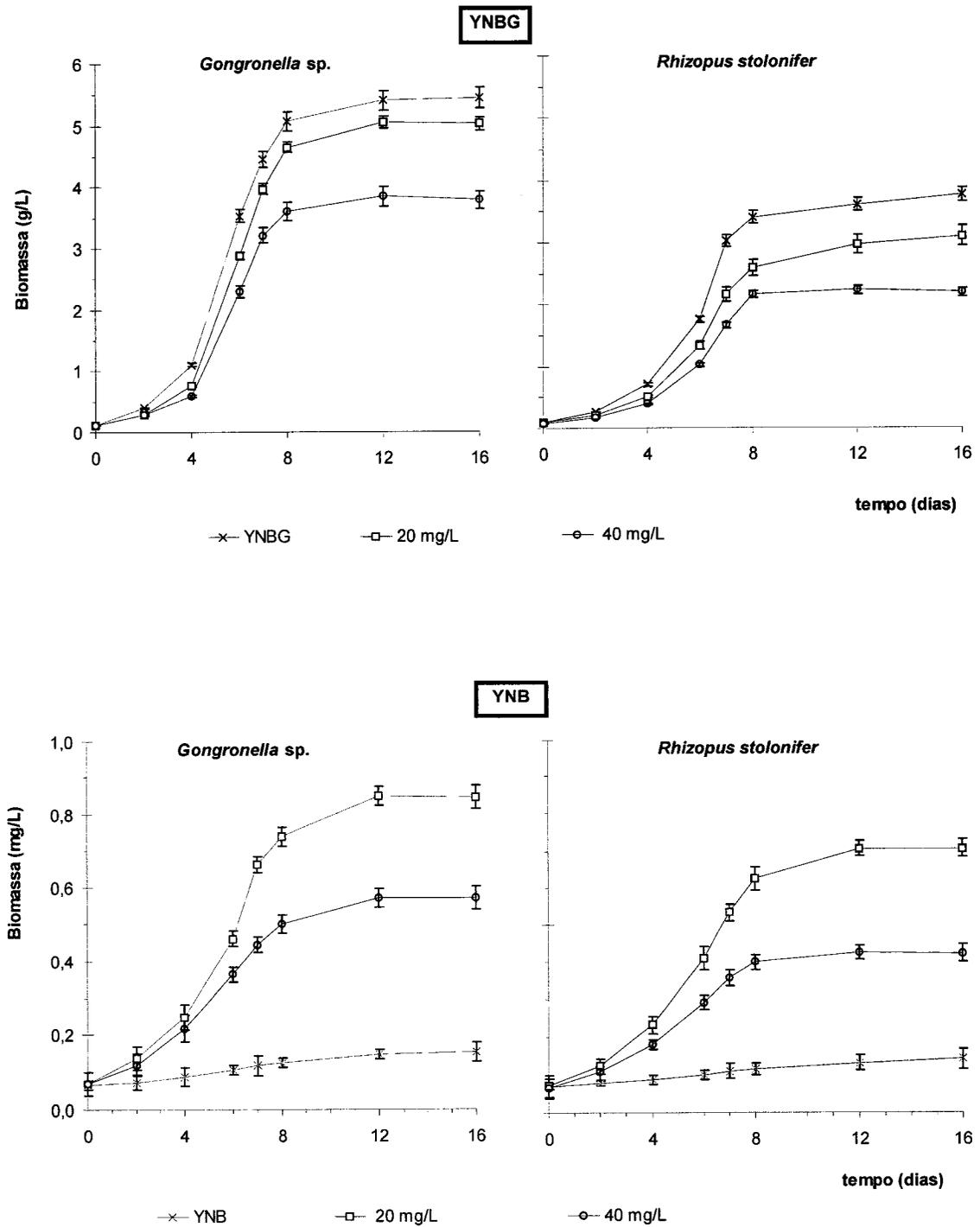


Figura 4.12 – Curvas de crescimento nas culturas de *Gongronella sp.* e de *Rhizopus stolonifer* nos meios de YNB e de YNBG na presença de folpete. Cada ponto representa a média de 4 replicados \pm o desvio padrão.

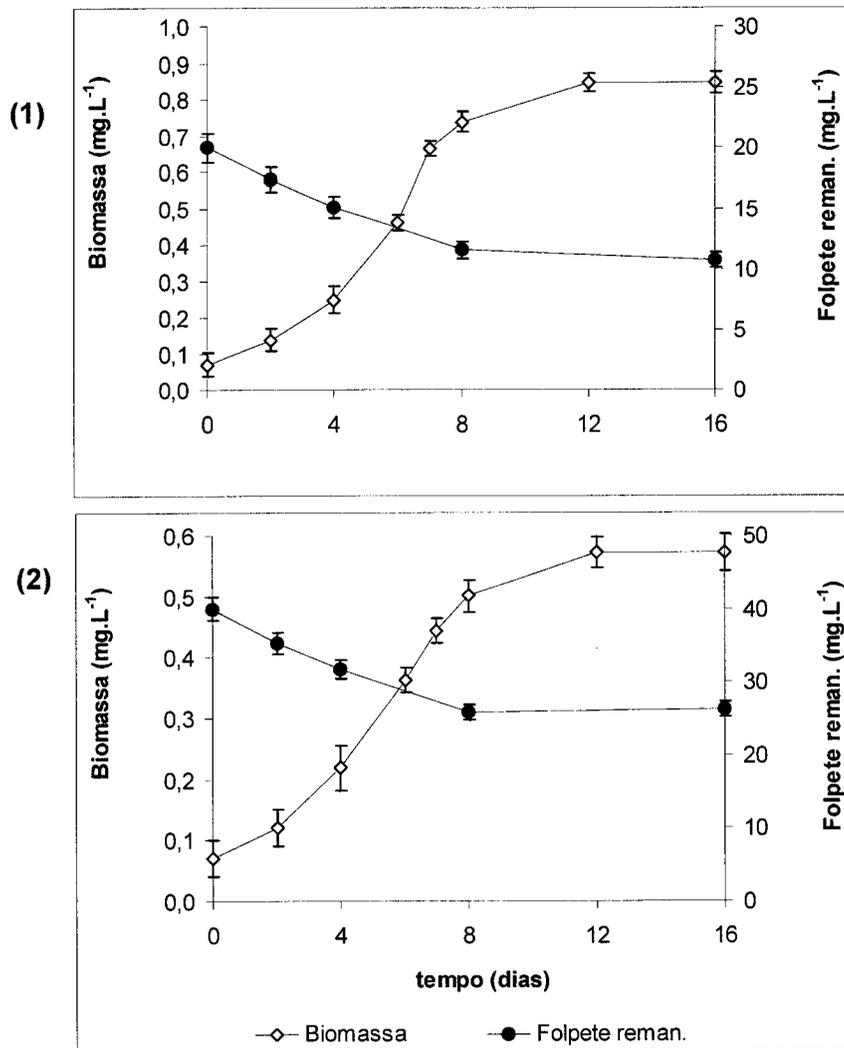


Figura 4.13 - Perfil do crescimento da biomassa de *Gongronella* sp. em relação ao perfil de degradação do folpete em meio de YNB para as duas concentrações estudadas: **(1)**: 20 mg.L⁻¹; **(2)**: 40 mg.L⁻¹. Aos valores de folpete remanescente foram subtraídos os valores de degradação abiótica.

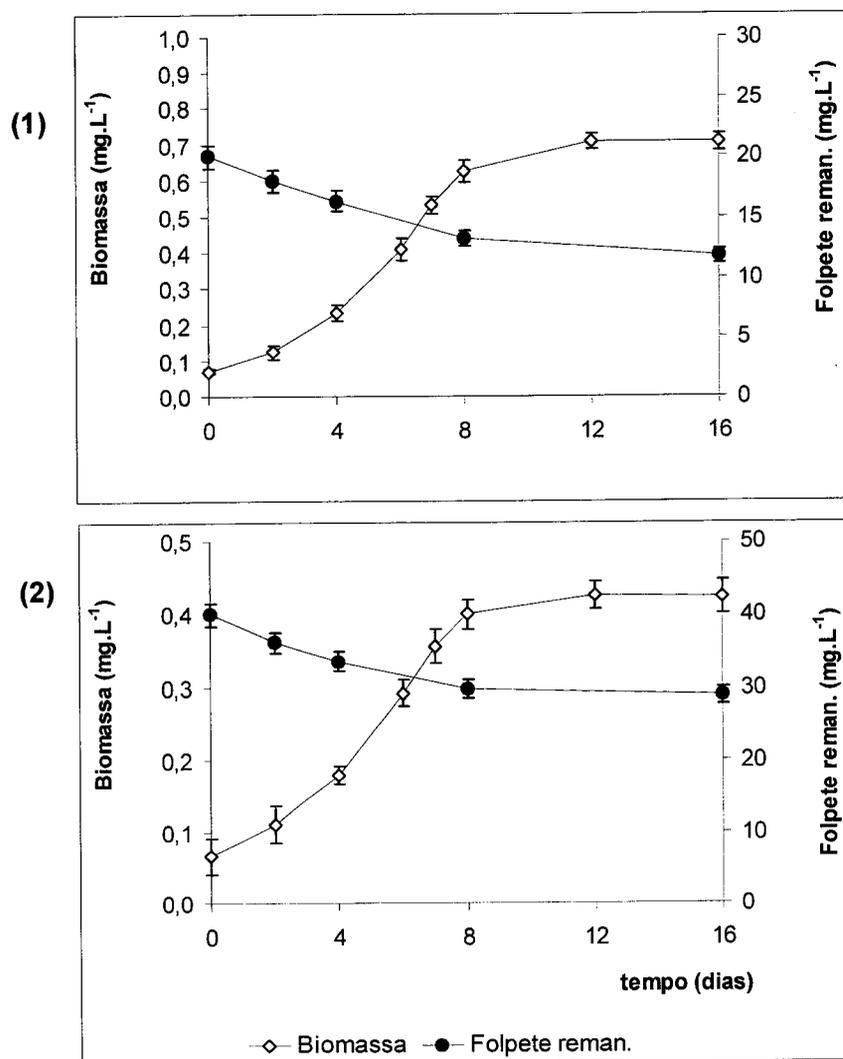


Figura 4.14 - Perfil do crescimento da biomassa de *Rhizopus stolonifer* em relação ao perfil de degradação do folpete em meio de YNB para as duas concentrações estudadas: **(1)**: 20 mg.L⁻¹ ; **(2)**: 40 mg.L⁻¹. Aos valores de folpete remanescente foram subtraídos os valores de degradação abiótica.

Na **tabela 4.7** apresentam-se os valores das taxas de degradação do folpete na ausência de microrganismos e na presença das estirpes de *Gongronella* sp. e de *R. stolonifer* bem como as taxas específicas de crescimento dos microrganismos, calculadas para os primeiros 8 dias de ensaio, uma vez que este foi o intervalo de tempo onde se observou uma proporcionalidade directa entre a quantidade de folpete degradado e o tempo de ensaio.

As taxas de degradação do folpete nas culturas de *Gongronella* e *R. stolonifer*, em YNBG foram, respectivamente, de 3,7 e 3,2 $\mu\text{M}\cdot\text{dia}^{-1}$ para a concentração inicial de 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e de 6,4 e 5,0 $\mu\text{M}\cdot\text{dia}^{-1}$ para a concentração de folpete inicial de 40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Nas culturas em YNB, as taxas de degradação do folpete pelas espécies *Gongronella* e *R. stolonifer*, oscilaram entre 3,5 e 2,8 $\mu\text{M}\cdot\text{dia}^{-1}$ e entre 6,5 e 4,2 $\mu\text{M}\cdot\text{dia}^{-1}$ para as concentrações iniciais de 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e 40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de folpete, respectivamente (**tabela 4.7**).

Para cada um dos fungos em estudo, observou-se um aumento das taxas de degradação do folpete com a concentração de fungicida presente em solução e mesmo na culturas em que o folpete foi a única fonte de carbono, os fungos seleccionados foram capazes de degradar o folpete e de o utilizar como fonte de carbono.

Além disso, observou-se que as concentrações de folpete degradado apenas pelos microrganismos foram inferiores às observadas nos estudos de degradação abiótica, no entanto não se observou um aumento proporcional de ftalimida.

Tabela 4.7 - Taxas específicas de crescimento (μ) observadas para as estirpes seleccionadas e das taxas de degradação de **folpete** nos estudos de degradação abiótica e biótica. São apresentados os valores médios \pm desvio padrão. As taxas de degradação do folpete foram expressas em $\mu\text{M}\cdot\text{dia}^{-1}$.

Meio de cultura	[folpete] _{inicial}		Estirpes fúngicas	Taxas de crescimento μ (h^{-1})	Taxas de degradação do folpete ($\mu\text{M}\cdot\text{dia}^{-1}$)		
	($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	(μM)			Total	Abiótica	Biótica
YNBG	20	67,44	<i>Gongronella</i>	$0,022 \pm 0,001$	$7,237 \pm 0,036$		$3,730 \pm 0,035$
			<i>R. stolonifer</i>	$0,019 \pm 0,002$	$6,724 \pm 0,013$	$3,507 \pm 0,005$	$3,217 \pm 0,009$
	40	134,9	<i>Gongronella</i>	$0,020 \pm 0,001$	$14,35 \pm 0,058$		$6,413 \pm 0,058$
			<i>R. stolonifer</i>	$0,018 \pm 0,001$	$12,97 \pm 0,049$	$7,932 \pm 0,070$	$5,036 \pm 0,059$
YNB	20	67,44	<i>Gongronella</i>	$0,013 \pm 0,002$	$6,949 \pm 0,021$		$3,516 \pm 0,025$
			<i>R. stolonifer</i>	$0,012 \pm 0,001$	$6,265 \pm 0,046$	$3,433 \pm 0,029$	$2,832 \pm 0,037$
	40	134,9	<i>Gongronella</i>	$0,011 \pm 0,001$	$14,345 \pm 0,058$		$6,531 \pm 0,054$
			<i>R. stolonifer</i>	$0,010 \pm 0,002$	$12,03 \pm 0,094$	$7,814 \pm 0,051$	$4,216 \pm 0,074$

As taxas de formação da ftalimida são apresentadas na **tabela 4.8**. As concentrações de ftalimida formada também aumentaram com a concentração de folpete utilizada. Nas culturas de *Gongronella* sp e *Rhizopus stolonifer*, na presença de $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de folpete, a concentração de ftalimida formada por dia foi, respectivamente, de 3,7 e 3,5 μM em ambos os meios (YNB e YNBG).

Tabela 4.8 - Registo dos valores das taxas de degradação de ftalimida (média \pm desvio padrão) nos estudos de degradação abiótica e biótica em YNBG e YNB.

Meio de cultura	[folpete] _{inicial}		Estirpes fúngicas	Taxas formação de ftalimida ($\mu\text{M}\cdot\text{dia}^{-1}$)		
	($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	(μM)		Total	Abiótica	Biótica
YNBG	20	67,44	<i>Gongronella</i> sp.	3,698 \pm 0,0094	3,208 \pm 0,022	0,490 \pm 0,009
			<i>R. stolonifer</i>	3,518 \pm 0,0182		0,309 \pm 0,020
	40	134,9	<i>Gongronella</i> sp.	5,872 \pm 0,0514	5,232 \pm 0,036	0,640 \pm 0,051
			<i>R. stolonifer</i>	5,886 \pm 0,0273		0,654 \pm 0,032
YNB	20	67,44	<i>Gongronella</i> sp.	3,7257 \pm 0,06019	3,2294 \pm 0,0315	0,496 \pm 0,046
			<i>R. stolonifer</i>	3,5291 \pm 0,0331		0,300 \pm 0,032
	40	134,9	<i>Gongronella</i> sp.	5,9230 \pm 0,02353	5,2596 \pm 0,0367	0,663 \pm 0,030
			<i>R. stolonifer</i>	5,7273 \pm 0,0281		0,467 \pm 0,032

Para a concentração de folpete de $40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ obteve-se uma concentração de ftalimida formada por dia de $5,9 \mu\text{M}$ para ambas as culturas em YNBG e de $5,9$ e $5,7 \mu\text{M}$ na presença de *Gongronella* sp. e de *R. stolonifer* respectivamente, em YNB. Nos ensaios sem microrganismos, a concentração de ftalimida formada por dia foi, respectivamente, de $3,2 \mu\text{M}$ para os meios com $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de folpete e de $5,2 \mu\text{M}$ para os meios com $40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de folpete.

4.3.3. Estudo da capacidade de degradação do metalaxil por biomassa obtida na fase estacionária

Como se observou que a biomassa na fase estacionária de crescimento continuou a degradar o metalaxil, embora a uma taxa inferior (**secção 4.3.1**), efectuaram-se estudos com biomassa de cada um dos fungos seleccionados, *Gongronella* sp. e *R. stolonifer*, com o objectivo de avaliar se após a fase de crescimento, estes fungos continuaram a utilizar o metalaxil como substrato de manutenção ou se ocorreu adsorção à biomassa. O perfil dos cromatogramas obtidos foi semelhante aos apresentados na **figura 4.1**.

As percentagens de metalaxil remanescentes obtidas para a *Gongronella* sp. e para o *R. stolonifer* estão apresentadas nos gráficos das **figuras 4.14 e 4.15**.

Nos ensaios em que não se adicionou microrganismo (controlo abiótico) e em que se utilizou a biomassa não viável, observou-se que a percentagem de metalaxil remanescente permaneceu praticamente constante ao longo do tempo (variou de 97 a 99%).

Nos ensaios efectuados com biomassa viável, o metalaxil remanescente ao fim de 24 horas, na presença de *Gongronella* e de *R. stolonifer*, foi, respectivamente, de 65% e 70 % para a concentração de 2 mg.L⁻¹, de 59% e 63 % para a concentração de 10 mg.L⁻¹ e de 78% e 82% para a concentração de 50 mg.L⁻¹ (**Figuras 4.14 e 4.15**).

Para ambos os microrganismos observou-se um aumento da quantidade de metalaxil degradada com a concentração até 10 mg.L⁻¹ e uma diminuição para a concentração de 50 mg.L⁻¹, confirmando o efeito inibitório do crescimento observado para concentrações elevadas de metalaxil.

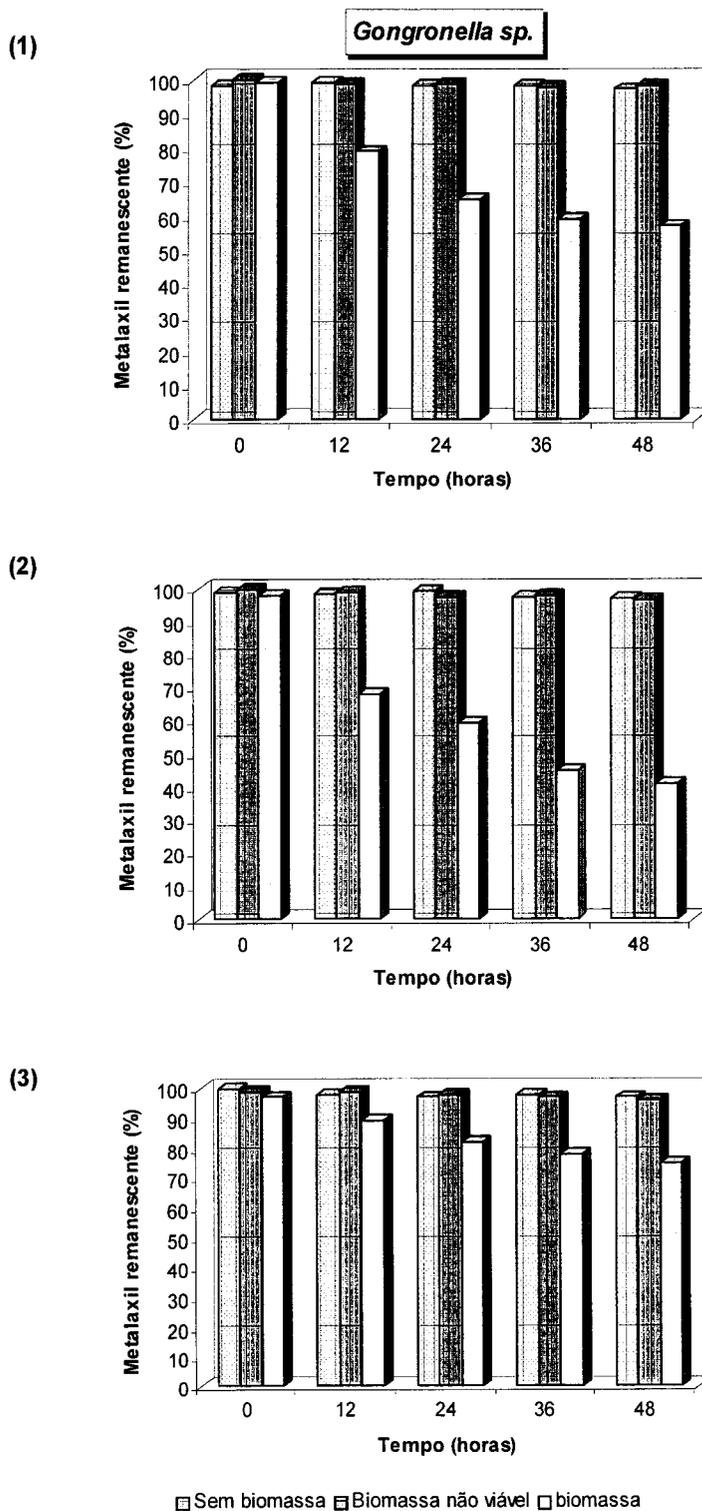


Figura 4.15 – Registo das percentagens de metalaxil remanescente no estudo de degradação do metalaxil na presença da biomassa de *Gongronella* sp. recolhida na fase estacionária, na presença das concentrações de metalaxil em estudo: (1) 2 mg.L⁻¹; (2) 10 mg.L⁻¹; (3) 50 mg.L⁻¹.

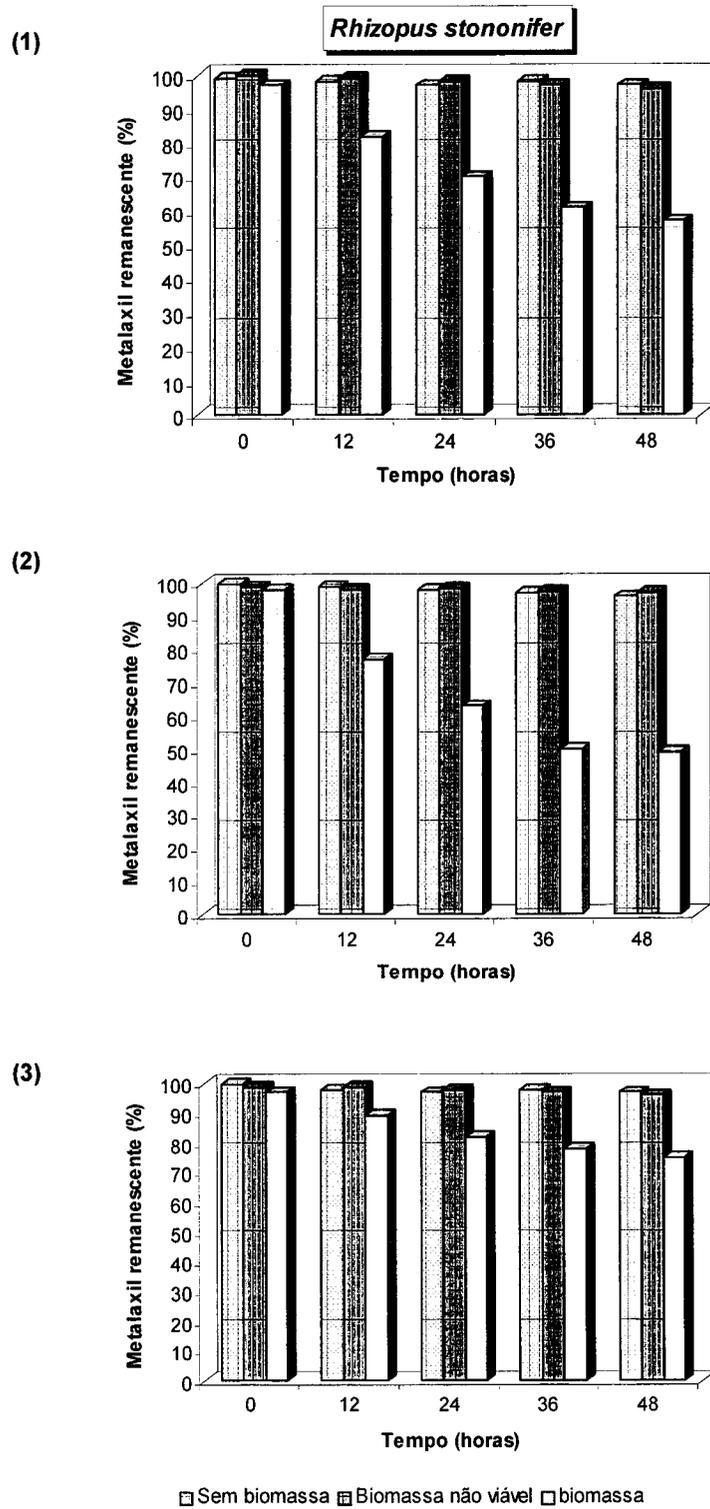


Figura 4.16 – Registo das percentagens de metalaxil remanescente no estudo de degradação do metalaxil na presença da biomassa de *Rhizopus stolonifer* recolhida em fase estacionária, na presença das concentrações de metalaxil em estudo: (1) 2 mg.L⁻¹; (2) 10 mg.L⁻¹; (3) 50 mg.L⁻¹.

4.3.4. Estudos cinéticos de crescimento dos fungos *Gongronella* sp. e *R. stolonifer* na presença de metalaxil

Nos ensaios anteriores observou-se que os fungos seleccionados conseguiram crescer em meios contendo metalaxil como única fonte de carbono mas que para concentrações mais elevadas havia uma inibição do crescimento. Assim, com o objectivo de avaliar o efeito do metalaxil como substrato inibitório, foram efectuadas culturas com os microrganismos seleccionados, nas quais se fez variar a concentração de metalaxil entre 2 mg.L⁻¹ e 140 mg.L⁻¹, tendo sido determinada, periodicamente, a biomassa em cada uma delas. Os valores das taxas específicas de crescimento obtidos são apresentados na **tabela 4.9**.

Nas culturas de *Gongronella* sp., observou-se um aumento da taxa específica de crescimento de 0,010 h⁻¹ para 2 mg.L⁻¹ até 0,180 h⁻¹ para 10 mg.L⁻¹ de metalaxil. No entanto, a partir da concentração de 20 mg.L⁻¹, a taxa específica de crescimento desta estirpe começou a diminuir, lentamente, de 0,170 h⁻¹ até 0,007 h⁻¹ para 140 mg.L⁻¹ de metalaxil.

Nas culturas de *Rhizopus stolonifer*, observou-se um aumento da taxa específica de crescimento de 0,010 h⁻¹ para 2 mg.L⁻¹ até 0,180 h⁻¹ para 20 mg.L⁻¹ de metalaxil. No entanto, a partir da concentração de 40 mg.L⁻¹, a taxa específica de crescimento desta estirpe começou a diminuir, lentamente, de 0,140 h⁻¹ até 0,008 h⁻¹ para 140 mg.L⁻¹ de metalaxil.

As representações gráficas das taxas específicas de crescimento em função da concentração de metalaxil para cada uma das espécies em estudo estão apresentados na **figura 4.17**.

Tabela 4.9 – Valores das taxas específicas de crescimento (μ) das espécies *Gongronella* e *R. stolonifer* em meios de cultura de YNB para as várias concentrações de metalaxil. São apresentados os valores médios de 4 replicados \pm o desvio padrão.

[Metalaxil] (mg.L ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	
	<i>Gongronella sp.</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>
2	0,0101 \pm 0,0003	0,0095 \pm 0,0001
4	0,0137 \pm 0,0001	0,0128 \pm 0,0002
6	0,0158 \pm 0,0002	0,0146 \pm 0,0003
8	0,0169 \pm 0,0002	0,0156 \pm 0,0002
10	0,0176 \pm 0,0002	0,0165 \pm 0,0002
20	0,0166 \pm 0,0006	0,0177 \pm 0,0001
40	0,0134 \pm 0,0006	0,0139 \pm 0,0001
60	0,0114 \pm 0,0001	0,0121 \pm 0,0002
80	0,0096 \pm 0,0002	0,0107 \pm 0,0001
100	0,0085 \pm 0,0002	0,0096 \pm 0,0001
120	0,0076 \pm 0,0003	0,0087 \pm 0,0001
140	0,0069 \pm 0,0001	0,008 \pm 0,0001

O metalaxil foi utilizado como fonte de carbono por ambos os microrganismos, tendo-se observado, como já referimos, um aumento da taxa específica de crescimento com a concentração de metalaxil presente, até um determinado valor. A partir desse valor (que corresponde a 10 mg.L⁻¹ nas culturas de *Gongronella sp.* e a 20 mg.L⁻¹ nas culturas de *Rhizopus stolonifer*), observou-se uma inibição na taxa específica de crescimento dos microrganismos com a concentração de fungicida, indicando que estamos na presença de um substrato inibitório.

Os perfis de crescimento obtidos para os dois fungos (**Figura 4.17**) apresentaram um comportamento que segue o modelo de inibição descrito por Haldane. Nas culturas de *Gongronella* sp. e de *R. stolonifer* observámos que as taxas específicas de crescimento, em culturas com o metalaxil como fonte de carbono após atingirem os seus valores máximos foram diminuindo com o aumento gradual de metalaxil, tendo-se obtido, para cada microrganismo uma mesma taxa específica de crescimento para duas concentrações distintas de substrato, excepto quando $\mu = \mu_{\text{máx}}$, como acontece no modelo de inibição de Haldane.

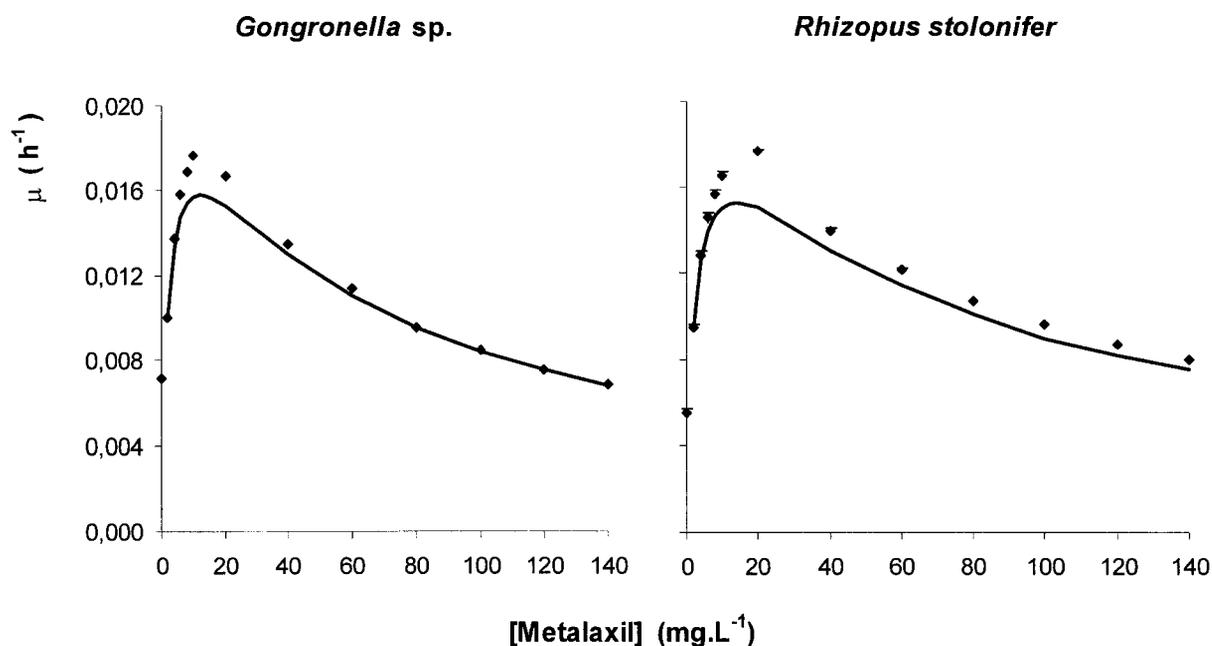


Figura 4.17 – Relação entre as taxas específicas de crescimento de *Gongronella* sp. e de *Rhizopus stolonifer* e a concentração de metalaxil utilizada como única fonte de carbono. Cada ponto experimental representa a média de 3 ensaios. A linha contínua representa o modelo teórico de Haldane.

A linearização dos valores obtidos experimentalmente para os ramos ascendentes (valores não inibitórios) e descendentes (valores inibitórios) da curva da **figura 4.16** encontra-se representada nas **figuras 4.17** e **4.18** respectivamente.

A representação gráfica de $1/\mu$ em função de $1/[S]$ (linearização de Lineweaver-Burk) foi utilizada para calcular $\mu_{\text{máx}}$ e K_s , para concentrações de metalaxil não inibitórias, onde a intercepção no eixo das ordenadas corresponde a $1/\mu_{\text{máx}}$ e a ordenada na origem é igual a $-1/K_s$ (**Figura 4.17**). Estes parâmetros foram também calculados pelos métodos de linearização de Eadie – Hofstee e de Langmuir como se apresenta na **tabela 4.6**.

Para a determinação de K_i e de $\mu_{\text{máx}}$ na presença de concentrações de metalaxil utilizou-se, como já se referiu a representação de $1/\mu$ versus $[S]$ onde a intercepção com o eixo YY' é igual a $1/\mu_{\text{máx}}$ e o declive é igual a $1/(k_i \cdot \mu_{\text{máx}})$ (**Figura 4.18**).

Utilizou-se a relação de Andrews para o cálculo de S_{mi} . Os valores calculados são apresentados na **tabela 4.6**. O valor de S_{mi} é particularmente importante nos estudos de degradação do metalaxil em descontínuo, pois permite estabelecer quais as concentrações de metalaxil a testar.

Os resultados apresentados nas **tabelas 4.10** e **4.11** indicam que o metalaxil foi utilizado como substrato não inibitório pela *Gongronella* sp. até à concentração de 0,44 mM (12,3 mg.L⁻¹) e pelo *R. stolonifer* até à concentração de 0,51 mM (14,3 mg.L⁻¹), com valores de K_s de 8,4 μM e de 7,7 μM , respectivamente. O valor médio de $\mu_{\text{máx}}$ calculado foi de 0,022 h⁻¹ para a *Gongronella* sp. e de 0,020 h⁻¹ para o *R. stolonifer*. Os valores de K_i para o metalaxil foram de 0,23 mM (64 mg.L⁻¹) para a *Gongronella* sp. e de 0,34 mM (95 mg.L⁻¹) para o *R. stolonifer*. Assim, ambos os microrganismos, na presença de metalaxil que funciona como substrato limitante, apresentaram baixos valores de K_s e valores relativamente elevados de K_i indicando que os microrganismos seleccionados conseguem tolerar elevadas concentrações de metalaxil.

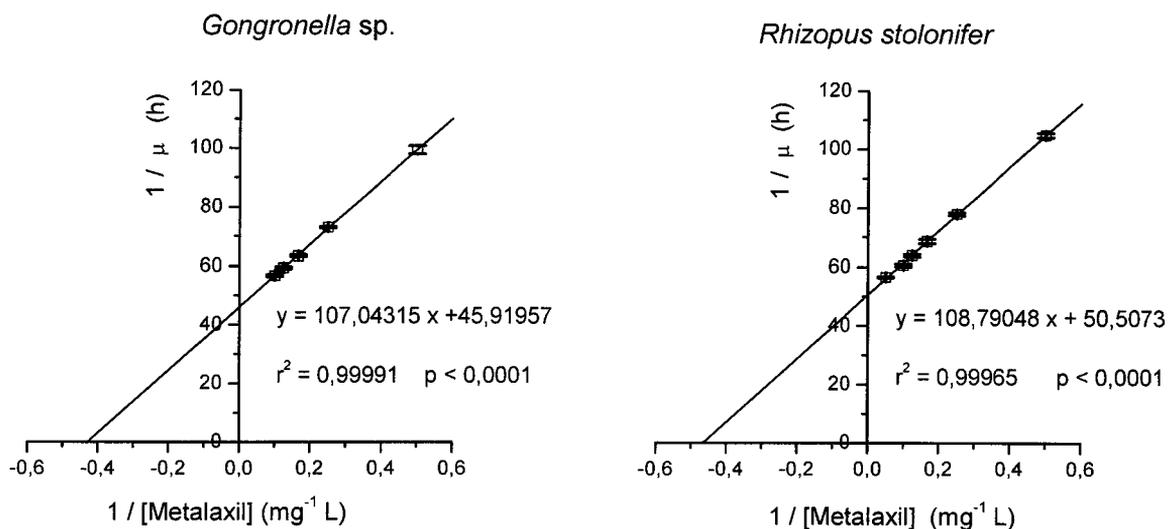


Figura 4.18 – Linearização das concentrações não inibitórias de metalaxil pelo método de Lineweaver-Burk (ramo ascendente dos gráficos da **figura 4.17**).

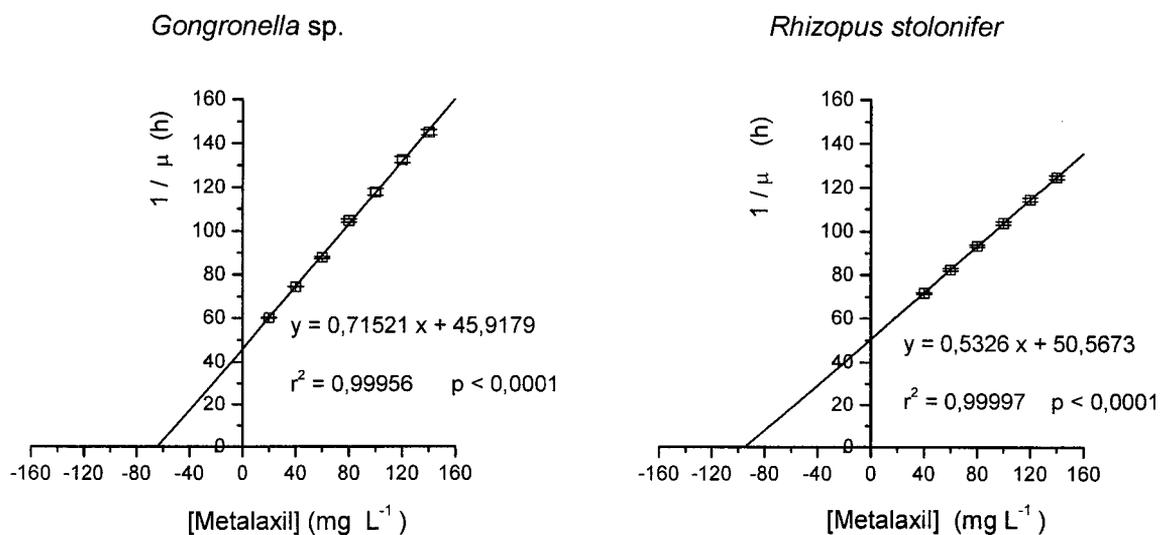


Figura 4.19 – Linearização das concentrações inibitórias de metalaxil (ramo descendente dos gráficos da **figura 4.17**)

Tabela 4.10 – Valores das constantes cinéticas $\mu_{\text{máx}}$ e K_s obtidas por três métodos de linearização para as estirpes de *Gongronella* sp. e *Rhizopus stolonifer* quando cultivadas em meio de YNB na presença de metalaxil como única fonte de carbono.

Estirpe	Métodos de Linearização	$\mu_{\text{máx}}$	K_s	
		(h ⁻¹)	(mg. L ⁻¹)	(mM)
<i>Gongronella</i> sp.	Lineweaver-Burk	0,02177	2,331	0,00836
	Eadie – Hofstee	0,02180	2,331	0,00837
	Langmuir	0,02180	2,322	0,00834
<i>R. stolonifer</i>	Lineweaver-Burk	0,0198	2,154	0,00774
	Eadie – Hofstee	0,0198	2,144	0,00770
	Langmuir	0,0195	2,03	0,00729

Tabela 4.11 – Valores das constantes cinéticas $\mu_{\text{máx}}$ e K_i e de S_{mi} para as estirpes de *Gongronella* sp. e *Rhizopus stolonifer* obtidas nas culturas de YNB na presença de metalaxil como única fonte de carbono.

Estirpe	$\mu_{\text{máx}}$	K_i		S_{mi}	
	(h ⁻¹)	(mg. L ⁻¹)	mM	(mg. L ⁻¹)	mM
<i>Gongronella</i> sp.	0,02178	64,20	0,231	12,33	0,044
<i>R. stolonifer</i>	0,01978	94,94	0,341	14,30	0,051

4.4. DISCUSSÃO

A dinâmica das populações microbianas na presença de substâncias tóxicas tem sido estudada em meio líquido para elucidação de como os microrganismos respondem à presença destas substratos, em particular quando se trata de microrganismos com capacidade para degradar esses compostos até determinadas concentrações (Bailey & Ollis, 1986, Doran, 2000).

Os resultados obtidos em meios aquosos contendo metalaxil mostraram que os fungos seleccionados, *Gongronella* sp. e *R. stolonifer*, apresentaram capacidade para degradar o metalaxil e também para o utilizar como fonte de carbono. Estudos da transformação microbiana do metalaxil efectuados por Zeng *et al.* (1989) referem que o fungo *Syncephalastrum racemosum* apresentou uma elevada capacidade para degradar o metalaxil. Poderá haver alguma relação de similaridade entre os fungos seleccionados no nosso estudo e o fungo isolado por Zeng *et al.* (1989) uma vez que *Gongronella* sp., *Rhizopus stolonifer* e *Syncephalastrum* pertencem ao grupo dos Zigomicetes (Domsch *et al.*, 1980).

Os estudos de degradação do metalaxil em meio aquoso, mostraram que as estirpes *Gongronella* sp. e *Rhizopus stolonifer* conseguiram degradar o metalaxil até concentrações de 10 mg.L^{-1} , sem inibição da taxa específica de crescimento mas que na presença de 50 mg.L^{-1} de metalaxil apesar da taxa de degradação ter aumentado, houve uma diminuição na taxa específica de crescimento dos fungos. Assim, concentrações mais elevadas de metalaxil parecem ter provocado um efeito inibitório no crescimento dos microrganismos, apesar destes ainda terem conseguido degradar o fungicida.

Os resultados apresentados, diferiram um pouco dos referidos por Zeng *et al.* (1989) nos quais o fungo *S. racemosum* apresentou um aumento da taxa de degradação

do metalaxil só até valores de 5 mg.L^{-1} , tendo havido, para valores superiores, uma diminuição das taxas de degradação com a concentração apesar do perfil de crescimento do *S. racemosum* não ter apresentado alteração com o aumento da concentração.

Os estudos em meios aquosos com folpete mostraram que este composto é rapidamente metabolizado mesmo na ausência de microrganismos e que as taxas de degradação abiótica foram superiores às obtidas por acção dos microrganismos. O principal metabolito formado foi a ftalimida, quer na presença quer na ausência de microrganismo, que também é uma substância que inibe o crescimento dos microrganismos, e estudos efectuados durante 1 mês mostraram que a ftalimida não diminuía significativamente na presença do microrganismo. Apesar da diminuição da biomassa formada, nos ensaios contendo glucose (YNBG), ter sido proporcional à concentração de folpete presente, nos ensaios efectuados com folpete como única fonte de carbono (YNB) mostraram que as culturas de *Gongronella* sp. e de *R. stolonifer* conseguiram utilizar este fungicida como substrato, com produção de biomassa. No entanto, a quantidade máxima de biomassa formada na presença de folpete foi bastante inferior à obtida na presença de metalaxil nos ensaios em YNB, mostrando um efeito inibitório sobre o crescimento dos microrganismos superior quer para o folpete quer para a ftalimida.

Os estudos de degradação foram realizados, em paralelo, para o metalaxil e para o folpete porque, como já se referiu, o fungicida comercial utilizado no controlo do míldio da videira, contém metalaxil e folpete na sua composição. No entanto, no presente trabalho, não se deu continuidade aos estudos de degradação do folpete por este ter apresentado uma taxa de degradação abiótica elevada, com formação de grandes quantidades de ftalimida e também porque os microrganismos seleccionados não apresentaram capacidade para utilizar este metabolito como substrato.

Desta forma, os estudos cinéticos e os estudos de degradação com os microrganismos seleccionados em solos incidiram apenas sobre o metalaxil, que aliás é dos dois fungicidas estudados, o que tem maiores probabilidades, devido à sua baixa taxa de degradação abiótica em solos e, de permanecer mais tempo no solo e, que devido à sua elevada solubilidade em água e baixa adsorção ao solo, ser facilmente lixiviado com consequente contaminação de fontes de água subterrâneas (Aylmore & Di, 2000), pelo que, se torna importante removê-lo o mais rapidamente possível do solo e definir uma estratégia de biorremediação para este fungicida.

Os estudos efectuados na presença de glucose (meio de YNBG) mostraram que os organismos seleccionados, *Gongronella* sp. e *R. stolonifer*, quando estão em presença de metalaxil podem utilizá-lo como fonte de carbono e, simultaneamente, o metalaxil estimulou a utilização da glucose por esses microrganismos conduzindo a um aumento da produção de biomassa.

Nas culturas em YNB de *Gongronella* sp. e de *Rhizopus stolonifer* com metalaxil os microrganismos conseguiram utilizar o metalaxil como fonte de carbono e energia e, mesmo após a fase exponencial de crescimento, conseguiram degradar quantidades significativas de metalaxil, convertendo o substrato sem, no entanto, ter havido produção de biomassa.

Na fase estacionária, o metalaxil parece ter sido degradado através de um processo de metabolismo secundário, possivelmente para a produção de energia de manutenção para os microrganismos ou, eventualmente, através de um metabolismo de desintoxicação com produção de algum metabolito não identificado.

O estudo da degradação do metalaxil na presença da biomassa recolhida em fase estacionária mostrou que a percentagem de metalaxil remanescente diminuiu na presença dos microrganismos. A baixa degradação abiótica observada e o facto de não

se ter observado adsorção à biomassa não viável mostraram que as espécies *Gongronella* sp. e *R. stolonifer* apresentaram capacidade para metabolizar o metalaxil mesmo após a fase exponencial de crescimento. Assim, estes microrganismos, mesmo quando não utilizaram o metalaxil como fonte de carbono e energia, conseguiram eliminá-lo utilizando-o possivelmente como substrato de manutenção ou transformando-o através de um processo de metabolismo secundário.

O estudo do crescimento de *Gongronella* sp. e o *Rhizopus stolonifer* na presença de concentrações crescentes de metalaxil como única fonte de carbono, mostraram que este fungicida se comportou como um substrato inibitório e o perfil de crescimento apresentou um comportamento idêntico ao descrito pelo modelo cinético de Haldane (1930). Segundo Andrews (1968) e Hill & Robinson (1975), este modelo pode ser aplicado ao crescimento de microrganismos à custa de substâncias inibitórias que, em determinadas circunstâncias, poderão ser utilizadas como fonte de carbono ou de azoto. Alguns estudos referem que, em condições específicas, determinados compostos tóxicos podem ser utilizados como substratos inibitórios, por microrganismos específicos, como por exemplo o fenol que pode ser usado como fonte de carbono pelo *Fusarium flocciferum* Corda (Anselmo, 1992) e o cianeto que pode ser usado pelo *Fusarium oxysporum* como fonte de azoto (Pereira, 1996).

Ambos os microrganismos apresentaram um valor baixo de K_s na presença de metalaxil que funciona como substrato limitante e um valor de K_i relativamente elevado, indicando que os microrganismos seleccionados possuem capacidade de tolerar elevadas concentrações de metalaxil.

Nos estudos de crescimento efectuados na presença de metalaxil como substrato limitante, os baixos valores de K_s obtidos indicam que estes microrganismos apresentam uma afinidade elevada para o metalaxil. Os valores calculados pelos três métodos de

linearização foram muito semelhantes. Por vezes, nomeadamente para concentrações baixas de substrato, observam-se diferenças significativas nos valores calculados através da linearização de Lineweaver-Burk, apesar de ser método mais utilizado, pelo que, é normalmente indicado proceder ao cálculo dos valores também por outros métodos de linearização (Sinclair & Cantero, 1990; Doran, 2000, Copelland, 2000).

As duas estirpes seleccionadas conseguiram utilizar o metalaxil como fonte de carbono e energia e a capacidade que as estirpes apresentaram para remover o metalaxil foi induzida pelo fungicida. Apesar do efeito inibitório, as estirpes de *Gongronella* sp. e de *Rhizopus stolonifer*, mesmo em concentrações elevadas de fungicida, degradaram quantidades significativas de metalaxil e utilizaram-no como substrato.

No entanto, as taxas específicas de crescimento e os valores de S_{mi} obtidos para os dois fungos na presença de metalaxil como única fonte de carbono foram baixos, pelo que, para poder utilizar estes microrganismos como estratégia na biorremediação do metalaxil seria necessário otimizar primeiro o processo de crescimento das estirpes. As baixas taxas específicas de crescimento obtidas, neste estudo, podem ter sido devidas à quantidade limitada de alguns nutrientes essenciais, como por exemplo à limitação de oxigénio dissolvido, uma vez que o processo é oxidativo, como se observou nos estudos da **secção 2.3.4 do capítulo 2**. Por outro lado, como os ensaios foram efectuados em “batch”, não houve restituição de nutrientes, pelo que, as baixas taxas específicas de crescimento também podem ter sido devidas à quantidade limitada de outros nutrientes essenciais, podendo as taxas específicas de crescimento ser optimizadas num processo de cultura de “fed – batch” na qual se adicionam alguns nutrientes em intervalos de tempo definidos ou até mesmo em cultura contínua (Stanbury & Whitaker, 1984, Doran, 2000). No entanto, convém referir que as concentrações de metalaxil encontradas nos solos não se afastaram muito das utilizadas neste estudo (Sukul & Spittler, 2001a).

Embora as bactérias apresentem, geralmente, taxas específicas de crescimento mais elevadas e se adaptem facilmente à utilização dos xenobióticos como única fonte de carbono, os fungos filamentosos podem ser mais úteis em estratégias de biorremediação em substratos sólidos (Newcombe & Crowley, 1999). Por exemplo, uma estirpe de *Pseudomonas fluorescens* cresceu a uma taxa de $0,086 \text{ h}^{-1}$ num meio de cultura com 1 mM de cianeto (Kunz *et al.*, 1992) enquanto que uma estirpe de *Fusarium oxysporum* apresentou uma taxa específicas de crescimento máximo de $0,015 \text{ h}^{-1}$ para uma concentração de 2 mM, revelando uma maior capacidade do fungo tolerar o cianeto, embora cresça menos (Pereira, 1996). No entanto, as bactérias são menos eficazes nas estratégias de biorremediação *in situ*, nomeadamente em solos devido à capacidade de crescimento dos fungos sob a forma de hifas que lhes permite abranger uma maior superfície do solo, como já foi referido no **capítulo 1** (Novack *et al.*, 1995).

A tolerância apresentada pelos microrganismos seleccionados a concentrações elevadas de fungicida associada à capacidade de degradação observada nos meios aquosos e a uma grande afinidade destas estirpes para o metalaxil, expressa pelos baixos valores de K_s , parecem indicar que a aplicação destas estirpes em zonas contaminadas poderão ter um potencial de aplicação prático, com redução do tempo de meia-vida deste fungicida nos solos.

Apesar das culturas de *Gongronella* sp. terem apresentado valores de taxas de degradação superiores e, proporcionalmente, taxas específicas de crescimento superiores, relativamente às culturas de *Rhizopus stolonifer*, no estudo cinético constatou-se que os valores de $\mu_{\text{máx}}$ e K_s foram superiores para a estirpe de *Gongronella* sp.. Os elevados valores de K_i e de S_{mi} para *Rhizopus stolonifer* indicaram que esta estirpe ainda conseguiu ser mais tolerante a elevadas concentrações de metalaxil. Assim, não se considerou prudente optar pela selecção de uma estirpe em detrimento de outra uma vez que ambas parecem ter um bom potencial para degradar o metalaxil.

É importante avaliar a capacidade de adaptação de cada uma destas estirpes ao solo, pelo que, a estratégia a seguir, para uma possível utilização destes microrganismos na biorremediação do metalaxil no solo, passa por efectuar estudos de degradação do metalaxil por estes microrganismos em solos na ausência e na presença da população residente do solo que serão descritos e interpretados no capítulo 5 desta dissertação.

CAPÍTULO 5

Estudos de degradação do metalaxil por fungos seleccionados em amostras de solos

5.1. INTRODUÇÃO

Os processos de biorremediação nos solos, na medida em que estão condicionados pela existência de partículas sólidas que funcionam como suporte, seguem os modelos e as cinéticas dos processos de fermentação em estado sólido, apesar da fracção sólida propriamente dita ser nutricionalmente inerte.

Nos últimos anos, tem-se observado uma tendência para a utilização de técnicas de fermentação em estado sólido nos processos de biorremediação e de biodegradação de compostos orgânicos. A fermentação em estado sólido torna-se um processo simples e relativamente económico no qual é adicionado um número limitado de nutrientes e em

que pode ser apenas necessária a adição de pequenas quantidades de água durante o processo de fermentação (Langemaat & Pyle, 2001; Pandey, 2003). Esta técnica parece também ser muito útil na biorremediação de solos permitindo um tratamento *in situ*, no qual os microrganismos adicionados conseguem degradar os poluentes e diminuir a sua persistência no solo (Harris & Arnold, 1995; Pandey, 2001).

A fermentação em estado sólido (SSF – Solid State Fermentation) é geralmente definida como um processo fermentativo que ocorre na superfície de um substrato sólido natural ou de um suporte inerte, utilizado como suporte sólido, na ausência de água livre mas no qual o substrato possui humidade suficiente para suportar o crescimento e o metabolismo de certos microrganismos (Pandey, 2003).

As fermentações tradicionais desenvolvidas quer no oriente, como a produção de “Koji” no Japão, de “temph” ou “ragi” na Índia, quer no ocidente, como a produção de pão, queijo e cogumelos, a compostagem e a degradação de madeira, entre outras, são técnicas de fermentação em estado sólido (Raimbault, 1998; Pandey *et al.*, 2001). A partir da década de 1990, as técnicas de SSF desenvolveram-se bastante e passaram a utilizar-se não só para a produção de enzimas e de produtos bioactivos, requeridos essencialmente pela indústria farmacêutica e química, mas também como suporte para o desenvolvimento de bioprocessos como a degradação de resíduos agro-industriais, a biorremediação e a biotransformação de produtos tóxicos ou perigosos para o ambiente (Raimbault, 1998; Pandey *et al.*, 2001).

Os fungos filamentosos e os actinomicetes são os microrganismos mais frequentemente utilizados nos processos de fermentação em estado sólido. Os fungos apresentam algumas propriedades, tais como, o rápido crescimento do micélio sob a forma de hifas podendo ligar-se facilmente ao substrato ou à matriz sólida e a elevada tolerância à baixa actividade da água e à alta pressão osmótica, que lhes permitem,

dentro da microflora natural, ser os organismos mais eficientes e competitivos para a bioconversão de substratos sólidos (Raimbault, 1998).

Alguns fungos pertencentes aos Zigomicetes (*Mucor* spp., *Rhizopus* spp.), Ascomicetes (*Aspergillus* spp., *Penicillium* spp.) e Basidiomicetes (em particular os fungos da podridão branca da madeira, denominados frequentemente por “White Rot Fungi”) continuam a ser as estirpes mais usadas em SSF (Pandey *et al.*, 2001). Por exemplo, as estirpes de *Rhizopus* spp. têm sido frequentemente utilizadas nos processo de SSF para a bioconversão de compostos orgânicos na indústria alimentar e no tratamento de resíduos agro-industriais (Nagel *et al.*, 1999; Christen *et al.*, 2000; Sankpal *et al.*, 2001).

Existem vários factores a considerar num processo de fermentação em estado sólido, entre eles a selecção de uma estirpe e de um substrato adequado e a manutenção de determinados parâmetros físico-químicos e bioquímicos cruciais para o desenvolvimento do processo. Os principais factores, que afectam o crescimento microbiano na fermentação em fase sólida incluem a selecção dos organismos e do substrato adequado, o tipo e a dimensão do inóculo, o tamanho das partículas do substrato, o período de cultura, o conteúdo em água e humidade relativa, o controlo da temperatura da matéria fermentada e a manutenção da uniformidade da atmosfera gasosa no ambiente, isto é, a taxa de consumo de oxigénio e a taxa de produção de CO₂. (Raimbault, 1998; Pandey *et al.*, 2001).

Na fermentação em estado sólido o substrato não é solúvel e actua, simultaneamente, como fonte de nutrientes e como suporte físico, servindo de âncora para que os microrganismos se fixem (Pandey, 2003). O tipo, a fonte e a natureza de nutrientes essenciais, como o carbono e o azoto, são os factores mais importantes para qualquer processo fermentativo (Pandey, 2001). Também a densidade do inóculo terá

que ser adequada ao processo de fermentação, variando, normalmente, entre 10^6 e 10^9 esporos por grama de peso seco de sólido (Sankpal *et al.*, 2001).

Podem considerar-se duas estratégias diferentes de SSF consoante o objectivo: a escolha da fonte de carbono em função do microrganismo empregue e os produtos obtidos ou a selecção de um microrganismo em função de um determinado substrato a utilizar. Esta última é a estratégia aplicada quando se pretende seleccionar microrganismos que utilizem como fontes de nutrientes resíduos industriais e outros resíduos indesejáveis aplicados no ambiente (Pandey, 2001).

O tamanho das partículas do substrato também pode influenciar o crescimento microbiano e a actividade microbiana num substrato em particular. As partículas de pequenas dimensões permitem aumentar a superfície de contacto entre os nutrientes e a área superficial para a transferência de calor e trocas gasosas, no entanto, se forem demasiado pequenas podem formar uma massa demasiado compacta diminuindo drasticamente estes processos de transferência (Smith, 1990; Pandey, 2001).

O teor em humidade é, também, uma variável importante da SSF devendo ser controlado de forma a permitir o crescimento do micélio mas a evitar a proliferação bacteriana. Normalmente, o teor em humidade situa-se entre 25 a 40% (p/p) consoante o organismo e o substrato utilizado na cultura (Raimbault, 1998; Pandey, 2001). A temperatura e o pH também podem influenciar o processo de SSF, no entanto os seus limites dependem do microrganismo utilizado no processo (Pandey, 2001).

Finalmente, a agitação e o arejamento são processos fundamentais, não só para manter a aerobiose do processo como para evitar a acumulação de CO_2 , embora alguns processos sejam sensíveis à agitação vigorosa pois quebram a ligação do organismo ao substrato (Raimbault, 1998).

A quantificação da biomassa é um dos parâmetros essenciais para o estudo cinético e para a caracterização e optimização do processo de crescimento dos microrganismos. Um dos principais problemas da fermentação em estado sólido é a estimação da biomassa microbiana, devido à dificuldade de separar a biomassa dos substratos sólidos.

A medição directa da biomassa fúngica é dificultada devido à penetração dos fungos através do substrato e à ligação firme às partículas sólidas do substrato (Ooijkaas *et al.*, 1998; Pandey *et al.*, 2001). Podem, no entanto usar-se métodos indirectos para estimar a biomassa em SSF. Estes métodos são baseados na determinação do conteúdo de certos componentes da célula como quitina, proteínas, glucosamina (produzida pelos microrganismos), ácidos nucleicos e ergosterol (para os fungos), ou na determinação da actividade biológica, como por exemplo, do processo respiratório através das medições do consumo de O₂ e da produção de CO₂ (Ooijkaas *et al.*, 1998; Pandey *et al.*, 2001).

Porém, todos estes métodos indirectos têm as suas próprias limitações e podem não fornecer uma informação precisa sobre a biomassa, na medida em que o conteúdo dos diferentes componentes da célula pode mudar significativamente dependendo da espécie de fungo, das condições de crescimento e da idade de cultura (Ooijkaas *et al.*, 1998).

A determinação da concentração de ergosterol permite estimar a biomassa fúngica em amostras ambientais, devido à correlação que se observa entre a concentração de ergosterol e o peso seco do fungo (Seitz *et al.*, 1979). No entanto, devido às interacções entre a quantidade de ergosterol e as espécies fúngicas, tempo de cultura, estado de desenvolvimento (fase exponencial, formação de hifas e esporulação) e condições de crescimento (meio de cultura, pH e temperatura), a determinação da concentração de ergosterol não é um parâmetro utilizado para controlo da biomassa num processo

fermentativo, uma vez que não é um bom indicador da variação da biomassa ao longo do tempo (Raimbault, 1998; Pasanen *et al.*, 1999). Assim, apesar das suas limitações, a medição de trocas gasosas (determinação do consumo de O₂ dissolvido e do CO₂ produzido) é frequentemente utilizada para estimar a biomassa nos processos de SSF por ser um procedimento simples (principalmente em reactor) que pode fornecer uma informação relativamente próxima da realidade (Ooijkaas, 1998; Raimbault, 1998).

Nos estudos descritos neste capítulo, pretendeu-se confirmar a capacidade de degradação do metalaxil pelos fungos seleccionados, quando adicionados a amostras de solo, na presença e na ausência da população residente. Na tentativa de aproximar os ensaios laboratoriais das condições de campo, efectuaram-se ensaios em solos, nos quais o metalaxil foi adicionado como principal fonte de carbono e o solo foi utilizado como suporte sólido, nutricionalmente inerte apesar de conter outros nutrientes essenciais em solução que estão acessíveis aos microrganismos. O processo ocorreu na presença de baixos teores de água livre, uma vez que a matriz sólida (solo) possui humidade suficiente para suportar o crescimento e o metabolismo do microrganismos, aproximando-se de um processo de fermentação em estado sólido.

Para além da quantificação do metalaxil remanescente e, tendo presente a dificuldade da medição directa da biomassa, procedeu-se a uma avaliação qualitativa e semi-quantitativa dos microrganismos presentes, também para confirmar quais os fungos que predominavam ao longo do tempo e para avaliar a capacidade de adaptação dos fungos adicionados.

A quantificação da biomassa total foi estimada, indirectamente, pela determinação do O₂ consumido para avaliação do comportamento cinético dos fungos *Gongronella* sp. e *Rhizopus stolonifer*, na presença de metalaxil como substrato inibitório em amostras de solo.

5.2. MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1. Organismos

Os fungos utilizados nos ensaios deste capítulo foram as espécies *Gongronella* sp. e *Rhizopus stolonifer* isolados após o enriquecimento selectivo, nas condições descritas na secção 3.2.6 do capítulo 3.

5.2.2. Preparação do inóculo

O inóculo de cada estirpe fúngica foi preparado a partir de culturas crescidas em tubos de ensaio contendo PDA ou MEA suplementado com fungicida comercial com 5 dias de incubação a 28°C, como se indica na secção 4.2.3 do capítulo 4. Após as contagens em câmara de Neubauer, o volume do inóculo foi ajustado de forma a obter uma suspensão homogénea em soro fisiológico (NaCl 0,85 % p/v) que contenha 1×10^9 esporos por mL de inóculo. Na preparação do inóculo misto de *Gongronella* sp. e de *Rhizopus stolonifer* o volume final da suspensão foi ajustado de modo a que esta contivesse 1×10^9 esporos por mL de inóculo de cada estirpe.

5.2.3. Fungicidas utilizados:

O metalaxil com um grau de pureza de 99,7% (Riedel-de Haën) foi utilizado para os ensaios laboratoriais em fase sólida e como padrão na quantificação das amostras de metalaxil por HPLC. Nos ensaios laboratoriais, o metalaxil adicionado ao solo foi previamente esterilizado em autoclave (15 minutos a 121°C).

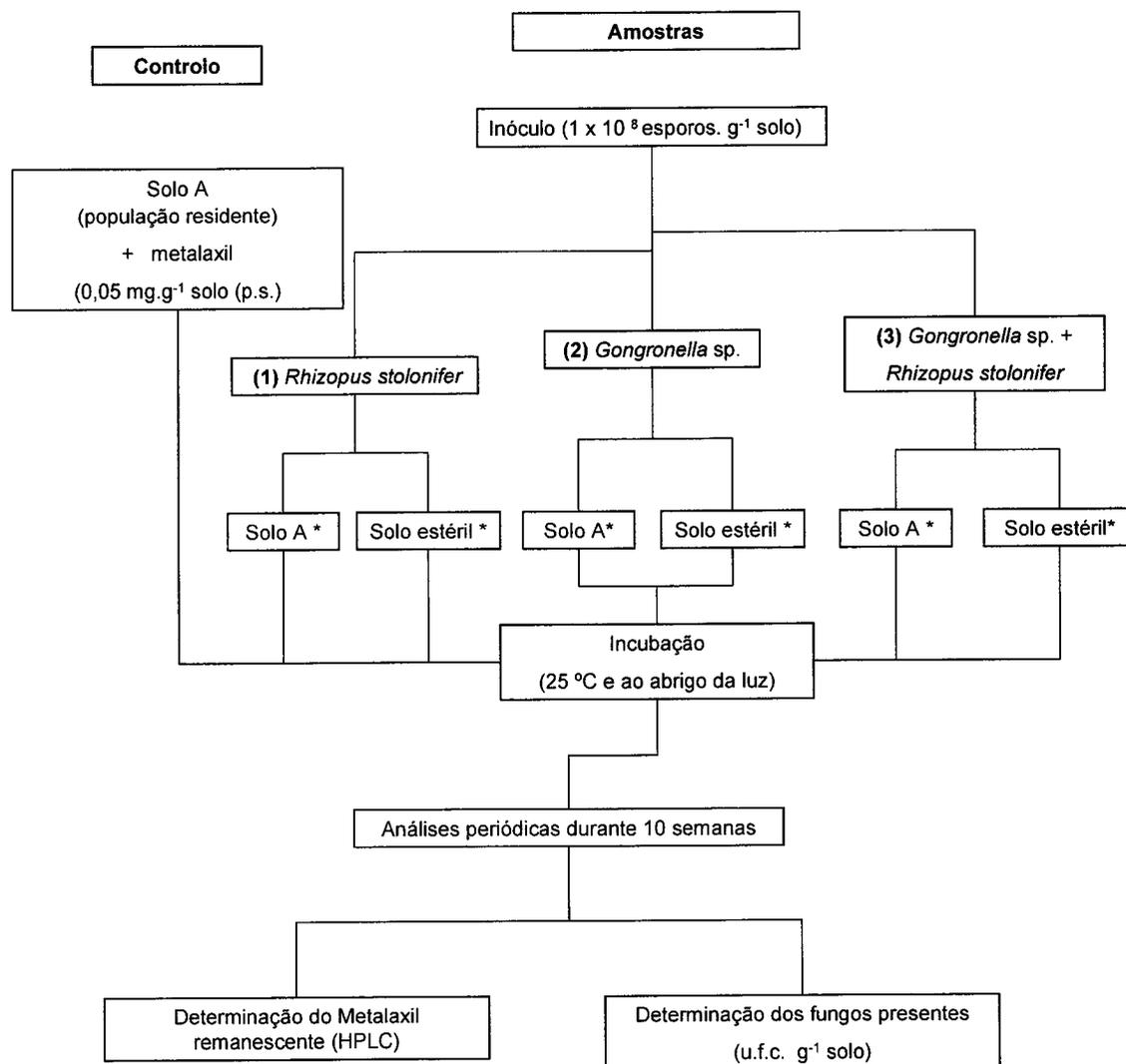
5.2.4. Solo em estudo

Os estudos foram efectuadas em amostras do solo da vinha com maior número de tratamentos com fungicida assinalado na **figura 2.1** como **solo A** e descrito no **capítulo 2** desta dissertação. Estudaram-se, simultaneamente, amostras sem população residente em que o solo foi previamente esterilizado em autoclave (30 minutos a 121°C em 3 dias consecutivos) e amostras com a população residente.

5.2.5. Avaliação do perfil de biodegradação do metalaxil

Neste estudo, o processo de degradação do metalaxil foi estudado em amostras de solo que diferem entre si apenas na quantidade e tipo de microrganismos presentes para avaliar a capacidade de biodegradação dos fungos seleccionados nas amostras de solo em presença e na ausência de população microbiana. Para avaliar a capacidade de degradação dos fungos seleccionados relativamente à população residente nas condições do ensaio preparou-se também um controlo utilizando apenas solo com população residente ao qual foi adicionado o fungicida.

Os ensaios foram efectuados com amostras de **solo A** por ter sido o solo que apresentou uma maior capacidade para degradar o metalaxil nos estudos descritos no **capítulo 2**. A concentração de metalaxil adicionada foi de 0,05 mg.g⁻¹ solo, correspondente à menor concentração de fungicida comercial estudada nos ensaios descritos no **capítulo 2** (0,5 mg de fungicida comercial por grama de solo). Escolheu-se esta concentração por ter sido, das concentrações estudadas, aquela em que o **solo A** apresentou maior taxa de degradação de metalaxil (**secção 2.3.3.1**) e também porque as concentrações de metalaxil que se estima encontrar nos solos são, geralmente, inferiores à concentração estudada. O procedimento experimental seguido está resumido no esquema apresentado na **figura 5.1**.



* Todas as amostras de solo já contêm metalaxil na concentração de 0,05 mg.g⁻¹ solo (p.s.)

Figura 5.1– Esquema do procedimento utilizado para avaliação da capacidade de biodegradação do metalaxil em solos pelas estirpes seleccionadas na presença e ausência de população residente e comparação com a capacidade de degradação da população residente (controlo).

Efectuaram-se, em paralelo três ensaios, para o solo esterilizado e para o solo com população residente, contendo metalaxil na concentração de $0,05 \text{ mg.g}^{-1}$ solo, que apenas diferiram no inóculo adicionado: **(1)** *Gongronella* sp., **(2)** *Rhizopus stolonifer* e **(3)** uma mistura de ambos os fungos (1:1). Como controlo prepararam-se amostras de solo A contendo $0,05 \text{ mg}$ de metalaxil por grama de solo.

5.2.5.1. Condições de crescimento

Para a preparação das amostras colocou-se cerca de 25% da mistura de solo em frascos Erlenmeyer de 500 mL e adicionou-se, gota a gota, a quantidade de metalaxil necessária, dissolvida em acetona. Após evaporação do solvente, foi adicionada a restante quantidade de solo e a mistura foi homogeneizada de modo a obter a concentração de metalaxil de $0,05 \text{ mg.g}^{-1}$ solo (p.s.). Posteriormente, adicionou-se o volume de inóculo (preparado segundo o procedimento indicado na **secção 5.2.2**) de um dos fungos seleccionados necessário para obter uma densidade de 10^8 esporos por grama de solo.

Amostras equivalentes de solo, contendo apenas a população residente, foram adicionadas de metalaxil na concentração de $0,05 \text{ mg.g}^{-1}$ solo (p.s.), nas quais o inóculo foi substituído por igual volume de soro fisiológico estéril (NaCl 0,85% p/v), foram estudadas para a avaliação da capacidade de degradação da população residente (controlo). Preparou-se também um controlo de degradação abiótica utilizando solo esterilizado em autoclave (30 minutos a 121°C em 3 dias consecutivos) com igual concentração de metalaxil e no qual o volume de inóculo foi substituído por soro fisiológico estéril. Amostras de **solo A** sem metalaxil mas com igual volume de solvente e com igual volume de inóculo foram preparadas para comparação do perfil cromatográfico.

As amostras foram incubadas ao abrigo da luz (para evitar a degradação abiótica) e analisadas periodicamente durante 10 semanas. As condições de humidade durante a

incubação foram mantidas próximo das iniciais por adição periódica de algumas gotas de água estéril tendo o cuidado de não deixar compactar o solo.

5.2.5.2. Extracção do fungicida

Para quantificação do metalaxil, alíquotas de 20 g de solo foram removidas de cada amostra após os vários períodos de incubação para frascos Erlenmeyer de 250 mL aos quais se adicionou 50 mL de acetonitrilo. As amostras foram colocadas num agitador orbital a 180 r.p.m., durante 4 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, os extractos foram centrifugados a 4000 r.p.m., filtrados através de membranas filtrantes de 0,45 µm (Millipore) e guardados a -20°C até se proceder à sua análise por HPLC.

O método de extracção foi previamente otimizado no que respeita à escolha do solvente e do tempo de extracção tendo em conta a solubilidade dos compostos, a estabilidade dos extractos e as percentagens de recuperação dos compostos a dosear, como se referiu na **secção 2.2.7.2 do capítulo 2**. As percentagens de recuperação do metalaxil nas amostras de solo obtidas foram de $97 \pm 2\%$.

5.2.5.3. Quantificação dos fungicidas

As amostras foram analisadas por HPLC. O sistema de HPLC utilizado foi o descrito na **secção 2.2.6 do capítulo 2** e as condições de ensaio são as descritas nessa secção, tendo-se feito variar apenas a composição e o fluxo da fase móvel. Utilizou-se uma fase móvel isocrática de acetonitrilo: água (60 : 40) com um fluxo de $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. O comprimento de onda do detector foi mantido a 210 nm.

O metalaxil foi identificado por comparação com o tempo de retenção do padrão de metalaxil, submetido às mesmas condições experimentais e foi quantificado, pelo método de calibração por padrão externo, por interpolação gráfica das áreas de pico na

respectiva curva de calibração. O intervalo de concentrações utilizado para construção da curva de calibração foi de 2,5 a 40 mg.L⁻¹. Para cada concentração foram efectuados 4 replicados para a construção da curva de calibração (**Anexo III – secção C**).

5.2.5.4. Análise Estatística

A experiência foi realizada com o objectivo final de comparar nos 4 grupos de ensaio (3 inóculos e um controlo) a capacidade de biodegradação do metalaxil.

Para analisar os efeitos da adição de inóculo contendo um ou os dois microrganismos seleccionados na degradação do metalaxil na presença e na ausência de população residente procedeu-se à análise de variância a dois factores fixos (ANOVA 2 factores tipo I) tendo sido comparadas as taxas de degradação do fungicida calculadas a partir dos valores de metalaxil degradado em cada um dos ensaios após a adição dos inóculos a solos com e sem população residente (Guimarães & Cabral, 1997; Bryman & Cramer, 2001; Maroco, 2003). A homogeneidade das variâncias populacionais foi confirmada pelo teste de Levene (Bryman & Cramer, 2001; Reis *et al.*, 2001).

A significância dos valores de F calculado estabelece-se para $p < p_{\text{value}}$ (**Sig**) (p_{value} é o valor de probabilidade de se obter um valor igual ou superior a F se a hipótese nula é verdadeira). No caso presente, consideraram-se as diferenças entre médias significativas quando a probabilidade de ocorrência foi superior a 99% ($p < 0,01$) e não significativas quando a probabilidade de ocorrência foi inferior a 95% ($p > 0,05$). Sempre que ocorreram diferenças significativas nos factores presentes nas análises de variância, a comparação múltipla de médias foi efectuada pelo teste de Tukey para determinar a sua significância estatística (Guimarães & Cabral, 1997; Reis *et al.*, 2001; Maroco, 2003). Na validação dos resultados por análise de variância e comparação múltipla de médias utilizou-se o programa SPSS para Windows, versão 11.0, *Copyright ©, Microsoft Corporation*.

5.2.6. Estudo microbiológico

Para a caracterização das populações microbianas e avaliação da capacidade de adaptação e crescimento das estirpes enriquecidas no solo na presença e ausência de população microbiana, prepararam-se suspensões com alíquotas de cada um dos solos em soro fisiológico (NaCl 0,85 % p/v) na proporção de 1:10 e efectuou-se a contagem e identificação em CRB dos fungos presentes no início e no final dos diferentes ensaios, tendo sido utilizado o método de diluições em placa como descrito na **secção 2.2.5 do capítulo 2**.

5.2.7. Avaliação do crescimento, em cultura pura, das estirpes de *Gongronella* sp. e de *Rhizopus stolonifer* no solo

Os estudos foram efectuados separadamente para a *Gongronella* sp. e para o *R. stolonifer* em amostras de solo esterilizado em autoclave, às quais foi adicionado metalaxil como fonte principal de carbono. Os inóculos de cada estirpe fúngica foram preparados como se indica na **secção 5.2.2**. Para cada microrganismo foram estudadas várias concentrações de metalaxil: 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120 e 140 mg.g⁻¹ solo. Como controlo, efectuaram-se ensaios com amostras de solo esterilizado sem fungicida, inoculadas também com os microrganismos em estudo.

5.2.7.1. Condições de Cultura

Os ensaios foram efectuados em frascos de 100 mL contendo 20 g de solo esterilizado com metalaxil na concentração de 0,05 mg por grama de solo e o inóculo de um dos microrganismos. Em ambiente estéril, foram colocados dentro de cada frasco cerca de 25% da mistura de solo e adicionaram-se as quantidades de metalaxil, dissolvido em cerca de 20 µL de acetona necessárias para obter a concentração em

estudo. Após evaporação do solvente foi adicionada a restante quantidade de solo e homogeneizada a mistura de solo. Em seguida, foram adicionados 2 mL de inóculo de um dos fungos para obter uma densidade de 10^8 esporos por grama de solo e a mistura de solo foi novamente homogeneizada. De forma a obter um sistema completamente fechado, os frascos foram tapados com uma rolha de borracha que impede as trocas gasosas e selados com cápsula de alumínio.

Os ensaios foram efectuados em separado para a *Gongronella* sp. e para o *Rhizopus stolonifer*.

5.2.7.2. Determinação do O₂ consumido

As determinações de O₂ na fase gasosa das culturas foram efectuadas num cromatógrafo de gás com detector de condutividade térmica, da marca HACH CARLE, modelo 100AGC, equipado com um forno regulado para 40°C e duas colunas de cromatografia de exclusão molecular (Alltech), utilizando como fase móvel o hélio C-50 (Gasin) a um fluxo de 20 mL.min⁻¹.

A separação foi feita por peneiro molecular em colunas de enchimento tendo sido utilizadas colunas com suporte SIV BX e partículas de 45-60 mesh de 3 m de comprimento e diâmetro interno de 2,2 mm. O oxigénio consumido foi determinado com base nas áreas dos respectivos picos, calculadas num integrador da marca Hewlett Packard, modelo 3390A.

As colheitas para a determinação do oxigénio foram efectuadas na fase gasosa das culturas às 0, 12, 24, 48 e 72 horas e diariamente até se ultrapassar a fase exponencial de crescimento das culturas. Para análise e quantificação do O₂ utilizou-se o procedimento descrito na **secção 2.2.8.2 do capítulo 2**.

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Avaliação da capacidade de degradação do metalaxil no solo pelas estirpes seleccionadas

De forma a avaliar a capacidade das estirpes seleccionadas, *Gongronella* sp. e *Rhizopus stolonifer*, para degradar o metalaxil presente nas amostras de solo foram determinadas as percentagens de degradação do metalaxil pelas populações microbianas seleccionadas, isoladamente e na presença de população residente do solo e efectuadas contagens periódicas do número de fungos presentes em cada período de ensaio.

O metalaxil foi separado ao tempo de retenção de 8,8 min para as condições cromatográficas descritas na **secção 5.2.5.3** deste capítulo.

As análises quantitativas do metalaxil foram efectuadas por interpolação gráfica da área de pico na respectiva curva de calibração. A equação da recta obtida foi de $y = 743785x + 27122$ com $r^2=0,9999$ (**Anexo III – secção C**).

Nas **figura 5.2 e 5.3** apresentam-se, como exemplo, os cromatogramas obtidos aos 0 e 42 dias para o **solo A** para o *Rhizopus stolonifer* e para a *Gongronella* sp. nos ensaios em estes fungos que foram adicionados às amostras de solo. Os cromatogramas obtidos aos 0 e 42 dias de incubação nos ensaios em que estes microrganismos foram inoculados em amostras de solo sem população residente (solo esterilizado em autoclave) apresentaram perfis semelhantes aos obtidos, para cada um dos fungos, nos ensaios com população residente (**Figuras 5.2 e 5.3**). Nos estudos efectuados com o inóculo misto também se obtiveram perfis cromatográficos semelhantes aos apresentados nestas figuras.

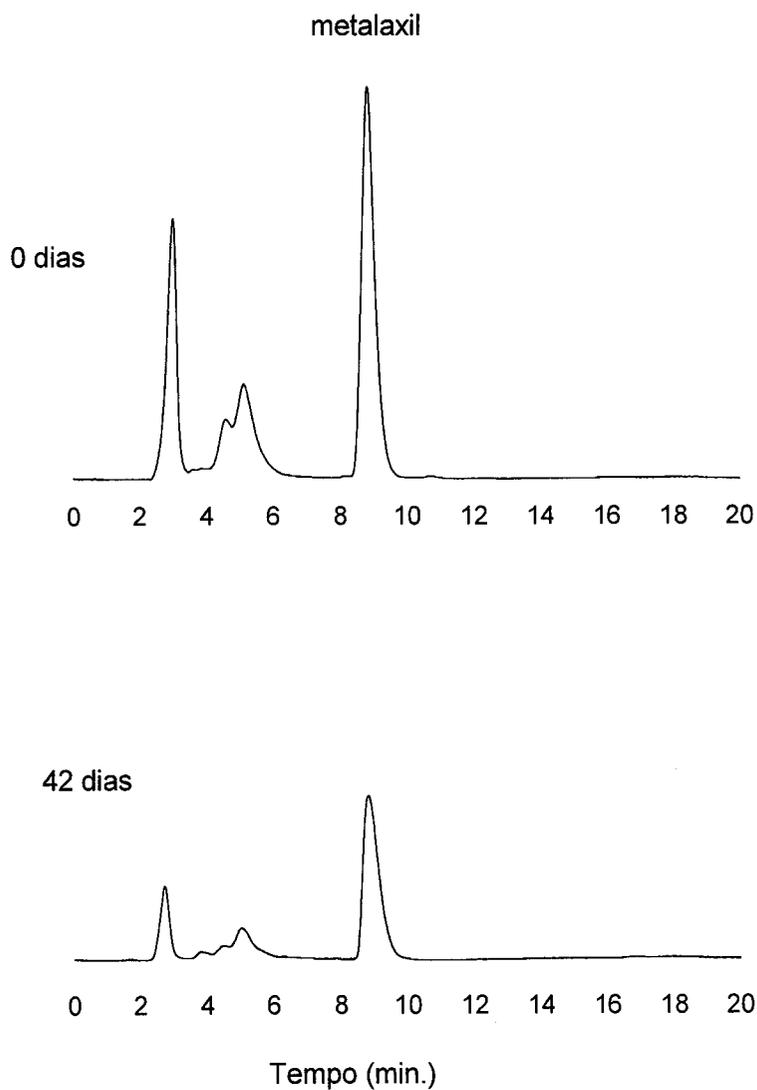


Figura 5.2 – Cromatogramas obtidos aos 0 dias e após 42 dias de incubação nas amostras de solo A contendo metalaxil na concentração de $0,05 \text{ mg.g}^{-1}$ solo (p.s) e às quais foi adicionado o inóculo de *Rhizopus stolonifer* ($T_{R(\text{metalaxil})} = 8,8 \text{ min}$)

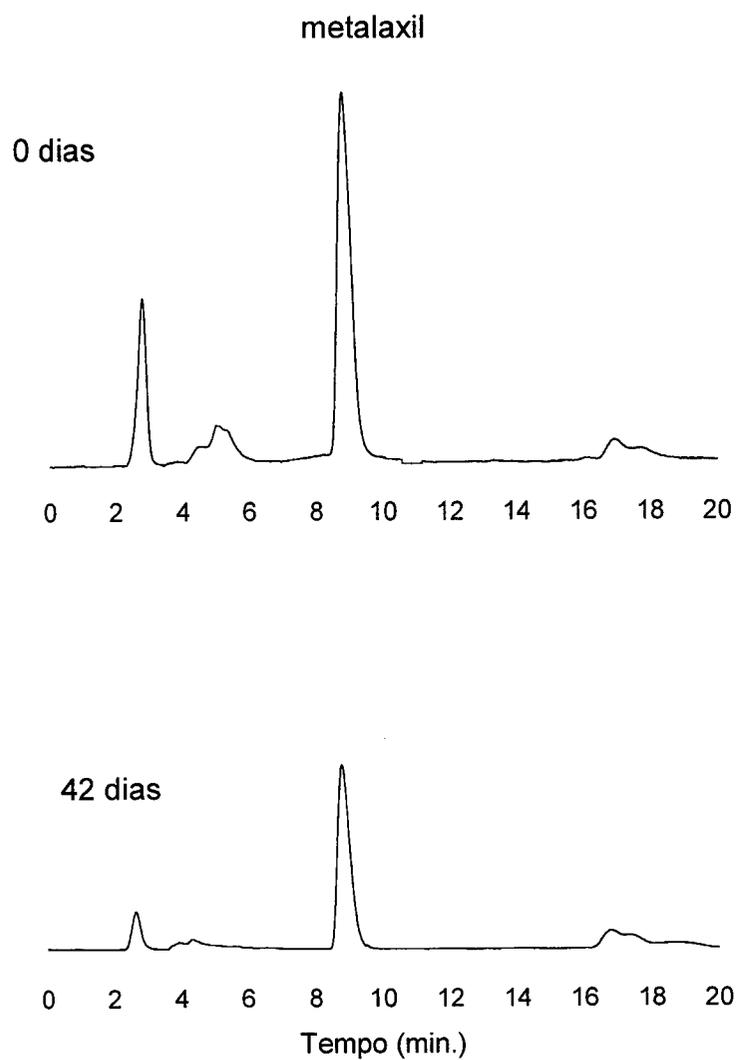


Figura 5.3 - Cromatogramas obtidos aos 0 dias e após 42 dias de incubação nas amostras de solo A contendo metalaxil na concentração de $0,05 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ solo (p.s) e às quais foi adicionado o inóculo de *Gongronella* sp. ($T_{R(\text{metalaxil})} = 8,8 \text{ min}$)

Nos cromatogramas obtidos observou-se uma diminuição da área de pico do metalaxil com o tempo de incubação, mas não se observou a formação de nenhum pico cromatográfico que pudesse corresponder a um possível metabolito do metalaxil.

Os valores da quantidade de metalaxil degradado aos 0, 42 e 72 dias de incubação no solo A, após a inoculação de um dos fungos seleccionados ou do inóculo misto, estão apresentados na **tabela 5.1**. O controlo corresponde à média dos três ensaios efectuados com amostras de solo A com população residente.

Para avaliar o perfil da degradação, na **figura 5.4** são apresentados os valores médios da percentagem de metalaxil remanescente ao longo do tempo.

Tabela 5.1 - Registo da quantidade de metalaxil degradado por grama de solo (peso seco) aos 0, 42 e 70 dias de incubação em amostras de solo com 50 µg de metalaxil por grama de solo após a adição de inóculo na presença de população residente (solo A) e em amostras equivalentes mas sem população microbiana. Os valores representam a média de 4 replicados ± desvio padrão.

Microrganismos	Tempo (dias)	Metalaxil degradado (µg. g ⁻¹ solo)		
		0	42	72
<i>Gongronella</i> sp.	Solo A	0,67 ± 0,11	24,68 ± 0,06	28,00 ± 0,09
	Solo A esterilizado	0,46 ± 0,09	22,11 ± 0,05	25,90 ± 0,06
<i>R. stolonifer</i>	Solo A	1,25 ± 0,14	24,59 ± 0,06	27,94 ± 0,08
	Solo A esterilizado	0,94 ± 0,07	22,75 ± 0,04	26,44 ± 0,11
<i>Gongronella</i> sp. + <i>R. stolonifer</i>	Solo A	0,69 ± 0,13	27,16 ± 0,05	30,75 ± 0,04
	Solo A esterilizado	0,72 ± 0,08	25,03 ± 0,08	29,21 ± 0,09
-----	Controlo (solo A)	0,75 ± 0,03	16,24 ± 0,09	18,59 ± 0,04

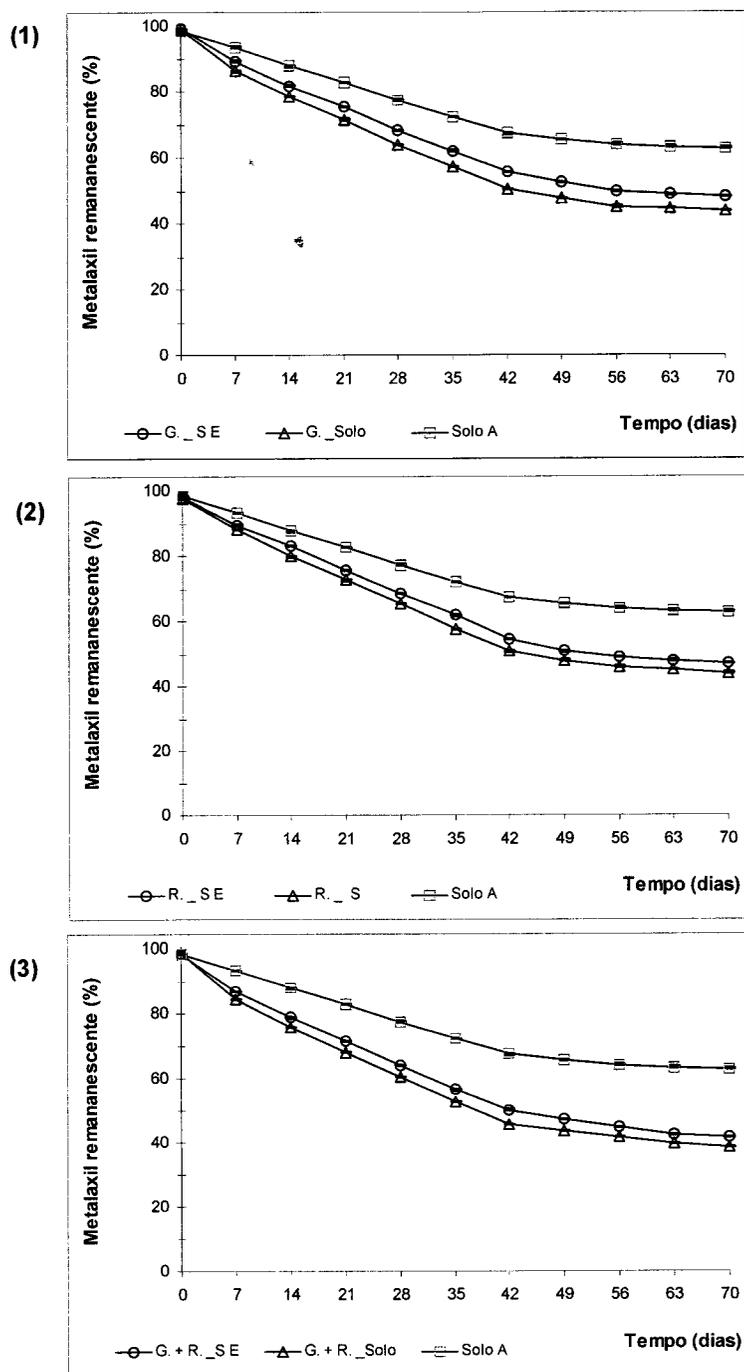


Figura 5.4 – Valores do metalaxil remanescente (%) nos solos em estudo pelas estirpes de *Gongronella* sp e *R stolonifer*. Cada ponto representa a média de 4 replicados \pm o desvio padrão. Cada gráfico representa o estudo efectuado na presença de um dos inóculos adicionado às amostras de solo: (1) *Gongronella* sp.; (2) *Rhizopus stolonifer* e (3) *Gongronella* e *R. stolonifer*. (G - inóculo de *Gongronella* sp.; R - inóculo de *Rhizopus stolonifer*, SE - solo esterilizado, S- solo com população residente).

Por análise da **tabela 5.1** e da **figura 5.4** observou-se que nas amostras de solo esterilizado às quais foi adicionado o inóculo de um dos microrganismos seleccionados, a quantidade de metalaxil degradada aos 42 dias oscilou entre 22 e 25 µg de metalaxil por grama de solo (44 a 50 %) tendo sido obtido o valor mais elevado para o inóculo misto dos dois fungos.

Na presença da população residente observou-se um ligeiro aumento da quantidade de metalaxil degradada nas amostras às quais foi adicionado o inóculo. Aos 42 dias obtiveram-se valores de metalaxil degradado que oscilaram entre 24 e 27 µg.g⁻¹ solo (48 a 50% da quantidade adicionada) enquanto que o valor médio obtido para o controlo (sem adição de inóculo) foi de 16 µg.g⁻¹ solo (33% da quantidade adicionada).

Após os 42 dias de incubação registou-se uma diminuição da percentagem de metalaxil degradado ao longo do tempo, embora se tenha observado uma diminuição do metalaxil presente nas amostras até ao final do ensaio.

Aos 70 dias, a quantidade de metalaxil degradada nas amostras de solo esterilizado oscilou entre 26 e 29 µg de metalaxil por grama de solo (52 a 56 %). Nas amostras de solo com população residente a quantidade de metalaxil degradada aos 70 dias variou entre 28 e 31 µg.g⁻¹ solo (56% e 59%). Em ambos os ensaios, o valor mais elevado de metalaxil degradado foi obtido para o inóculo misto de *Gongronella* sp. e *R. stolonifer*.

Amostras de solo esterilizado em autoclave, às quais não foi adicionado inóculo, foram utilizadas como controlo de degradação abiótica, tendo apresentado um valor de 97% metalaxil remanescente aos 42 dias de ensaio e um valor de 95% aos 70 dias de ensaio.

A ausência de microrganismos foi confirmada através da inoculação de suspensões destas amostras de solo em placas de Petri contendo MEA, não se tendo observado

unidades formadoras de colónias (ufc) após a incubação das placas durante 5 dias a 25°C.

Com base nos resultados obtidos foram calculadas as taxas de degradação entre os 7 e os 42 dias de ensaio ($r^2 > 0,997$). As taxas de degradação, expressas em μg de metalaxil degradado por dia por grama de peso seco de solo, são apresentados na **figura 5.5**.

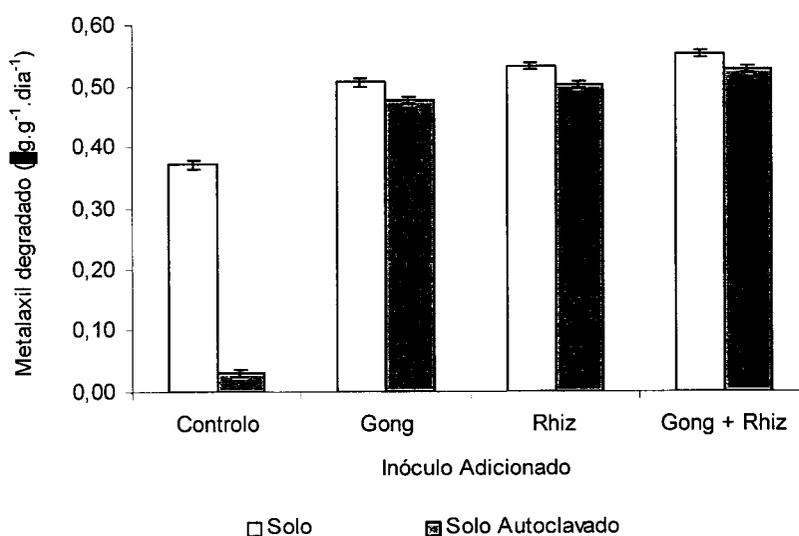


Figura 5.5 - Taxas de degradação do metalaxil expressas em $\mu\text{g}.\text{dia}^{-1}.\text{g}^{-1}$ solo (p.s). Os valores representam a média de quatro replicados \pm o desvio padrão. (Controlo – solo sem adição de inóculo; Gong – *Gongronella* sp.; Rhiz- *Rhizopus stolonifer*, Gong + Rhiz – Inóculo misto de *Gongronella* sp. e de *R. stolonifer*)

Os estudos em solos com população residente (solo) mostraram que a adição de um inóculo específico de *Gongronella* sp. ou de *R. stolonifer* bem como da cultura mista destes dois fungos melhorou significativamente o processo de biodegradação do metalaxil no solo ($p < 0,01$) (**Anexo IV**). As taxas de degradação médias obtidas após a adição de inóculo foram de $0,51 \mu\text{g}\cdot\text{dia}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ para *Gongronella* sp., de $0,53 \mu\text{g}\cdot\text{dia}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ para *R. stolonifer* e de $0,55 \mu\text{g}\cdot\text{dia}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ solo para o inóculo misto de *Gongronella* sp e *R. stolonifer* (1:1), enquanto que a taxa de degradação média do solo com população residente (controlo) foi apenas de $0,37 \mu\text{g}\cdot\text{dia}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ solo (**Figura 5.5**).

Quando os inóculos dos microrganismos seleccionados foram adicionados ao solo esterilizado (sem população residente), observou-se que estes microrganismos também foram capazes de aumentar a taxa de degradação do metalaxil. As taxas de degradação médias obtidas após a adição de inóculo ao solo esterilizado foram de $0,48 \mu\text{g}\cdot\text{dia}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ para *Gongronella* sp., de $0,50 \mu\text{g}\cdot\text{dia}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ para *R. stolonifer* e de $0,53 \mu\text{g}\cdot\text{dia}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ para inóculo misto (**Figura 5.5**).

A análise de variância (ANOVA) mostrou que as taxas de degradação foram significativamente diferentes para os vários estudos para um intervalo de significância de 99% ($p < 0,01$) (**Anexo IV**). Os testes de comparação múltipla de médias, efectuados pelo teste de Tukey mostraram que as médias foram significativamente diferentes quer para o solo esterilizado quer para o solo com população residente após a adição do inóculo adicionado e que também houve diferença significativa com o tipo de inóculo adicionado (**Anexo IV**).

5.3.2. Estudo microbiológico

Na tentativa de avaliar a viabilidade dos microrganismos adicionados nas amostras de solo com e sem população residente, procedeu-se periodicamente à determinação semi-quantitativa dos fungos presentes nas amostras de solo em estudo pelo método das diluições em placa.

A viabilidade dos microrganismos no solo foi avaliada através da determinação do número de unidades de formação de colónias (ufc) por grama de solo. Na **tabela 5.2** registaram-se os valores médios de ufc por grama de solo obtidos para a população fúngica observada em CRB em cada um dos estudos para os tempos de incubação de 0, 14, 42 e 70 dias.

O número de microrganismos aumentou ao longo do tempo de incubação correspondendo a uma boa adaptação dos microrganismos aos solos.

Os valores de ufc observados na amostras de solo oscilaram entre 10^5 e 10^7 para *Gongronella* sp. e de 10^6 a 10^8 para *Rhizopus stolonifer* nas amostras de solo esterilizado e nas amostras com população residente, após a inoculação dos fungos em cultura pura ou mista, mostrando que houve proliferação dos microrganismos após inoculação (**Tabela 5.2**).

No entanto, após os 42 dias de incubação observou-se uma ligeira diminuição dos microrganismos, que pode ter sido devida a uma diminuição do oxigénio disponível nos espaços entre as partículas do solo ou a uma acumulação de CO_2 e/ou de metabolitos secundários do micélio. Estes factores também poderão estar relacionados com a diminuição da taxa de degradação do metalaxil após os 42 dias de incubação (**Figura 5.4**).

Tabela 5.2 - Média de unidades de formação de colónias total (ufc) por grama de solo em CRB com cloranfenicol (população fúngica).

G. – *Gongronella* sp.; **R.** – *Rhizopus stolonifer*; **O. F.** – outros fungos

G? – Micélio estéril com características em MEA semelhantes às apresentadas pelo Micélio 3, que, após indução da esporulação, foi identificado como *Gongronella* sp.

Tempo (dias)	Inóculo	Solo Esterilizado (ufc g ⁻¹ solo)	Solo A (ufc g ⁻¹ solo)
0	<i>Gongronella</i> sp.	5,4 x 10 ⁵ G.	5,6 x 10 ⁵ G.; 3,1 x 10 ⁴ O. F.
14		2,7 x 10 ⁶ G.	3,2 x 10 ⁶ G.; 3,4 x 10 ⁴ O. F.
42		3,5 x 10 ⁷ G.	3,7 x 10 ⁷ G.; 3,8 x 10 ⁴ O. F.
70		2,8 x 10 ⁷ G.	2,9 x 10 ⁷ G.; 3,2 x 10 ⁴ O. F.
0	<i>Rhizopus stolonifer</i>	2,8 x 10 ⁶ R.	3,1 x 10 ⁶ R.; 3,2 x 10 ⁴ O. F.
14		2,1 x 10 ⁷ R.	2,8 x 10 ⁷ R.; 3,3 x 10 ⁴ O. F.
42		3,2 x 10 ⁸ R.	3,1 x 10 ⁸ R.; 3,2 x 10 ⁴ O. F.
70		7,2 x 10 ⁷ R.	5,2 x 10 ⁷ R.; 2,9 x 10 ⁴ O. F.
0	<i>R. stolonifer</i> + <i>Gongronella</i> sp.	5,2 x 10 ⁵ G.; 2,6 x 10 ⁶ R.	5,5 x 10 ⁵ G.; 3,0 x 10 ⁶ R.; 3,1 x 10 ⁴ O. F.
14		2,9 x 10 ⁶ G.; 2,1 x 10 ⁷ R.	3,1 x 10 ⁶ G.; 3,2 x 10 ⁷ R.; 3,3 x 10 ⁴ O. F.
42		2,3 x 10 ⁷ G.; 3,4 x 10 ⁸ R.	2,2 x 10 ⁷ G.; 3,1 x 10 ⁸ R.; 3,8 x 10 ⁴ O. F.
70		1,8 x 10 ⁷ G.; 6,7 x 10 ⁷ R.	1,8 x 10 ⁷ G.; 6,7 x 10 ⁶ R.; 3,4 x 10 ⁴ O. F.

Controlo - solo A (população residente)	
0	6,4 x 10 ³ G. (?); 5,1 x 10 ³ R.; 3,3 x 10 ⁴ O. F.
14	6,4 x 10 ³ G. (?); 6,3 x 10 ³ R.; 3,9 x 10 ⁴ O. F.
42	6,4 x 10 ³ G. (?); 7,5 x 10 ³ R.; 4,6 x 10 ⁴ O. F.
70	6,4 x 10 ³ G. (?); 6,9 x 10 ³ R.; 4,3 x 10 ⁴ O. F.

No controlo, foram encontrados ufc na ordem de 10^3 para *R. stolonifer* e para um micélio estéril com características semelhantes às de *Gongronella* sp. (G.?) e na ordem de 10^4 para os restantes fungos, como aliás também se observou nas amostras com população residente.

5.3.3. Estudo da cinética de degradação do metalaxil, em solos, pelos fungos *Gongronella* sp. e *Rhizopus stolonifer*

De forma a testar qual o efeito do metalaxil como substrato no crescimento dos microrganismos seleccionados foram efectuadas culturas isoladas, com cada um dos microrganismo seleccionados em que se fez variar a concentração de metalaxil.

O crescimento dos microrganismos foi avaliado de uma forma indirecta com base na determinação da taxa de consumo de oxigénio ($\text{mmol O}_2 \cdot \text{dia}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ solo). As taxas de consumo de O_2 foram determinadas no período correspondente aos primeiros 7 dias de cultura, no qual se observou um crescimento exponencial dos fungos, indicando que estes microrganismos estão a utilizar o metalaxil como substrato para produção de biomassa. Os resultados estão apresentados no gráfico da **figura 5.6**.

Neste estudo, observou-se um aumento da taxa de consumo de oxigénio como resposta ao aumento da concentração de metalaxil. No entanto, para concentrações elevadas, o metalaxil passou a ter um efeito inibitório sobre o crescimento dos microrganismos, com diminuição da taxa de consumo de oxigénio à medida que a concentração de metalaxil foi aumentando.

À semelhança dos resultados obtidos em meio líquido (descritos no **capítulo 4**), o metalaxil no solo comportou-se também como um substrato inibitório e a cinética dos microrganismos apresentou um perfil semelhante ao descrito pelo modelo de Haldane para substratos inibitórios (Beltrame *et al.*, 1980).

As taxas de consumo de Oxigénio obtidas para a *Gongronella* sp. e para o *R. stolonifer*, em culturas com metalaxil, após atingirem os seus valores máximos (cerca de 0,097 mmol O₂. dia⁻¹.g⁻¹ solo e 0,082 mmol O₂.dia⁻¹.g⁻¹ solo, respectivamente) foram diminuindo com o aumento gradual de metalaxil, tendo-se observado, para cada microrganismo a mesma taxa de consumo de O₂ para duas concentrações distintas de substrato, excepto quando $T = T_{máx}$, como indica o modelo de Haldane.

Nos estudos efectuados em amostras de solo, a taxa específica de crescimento (μ), utilizada na expressão de Haldane foi substituída pela taxa de consumo de Oxigénio (T), expressa em mmol de O₂.consumido por dia por grama de solo (Anselmo, 1992). Assim, a expressão utilizada para o cálculo dos parâmetros cinéticos foi a seguinte:

$$T = T_{máx} \frac{[S]}{K_s + [S] + ([S]^2/K_i)}$$

Nesta equação, T é a taxa de consumo de O₂, S é a concentração de substrato, $T_{máx}$ é a taxa de consumo de O₂ máxima, K_s é a constante de afinidade para o substrato e K_i é a constante de inibição para o substrato.

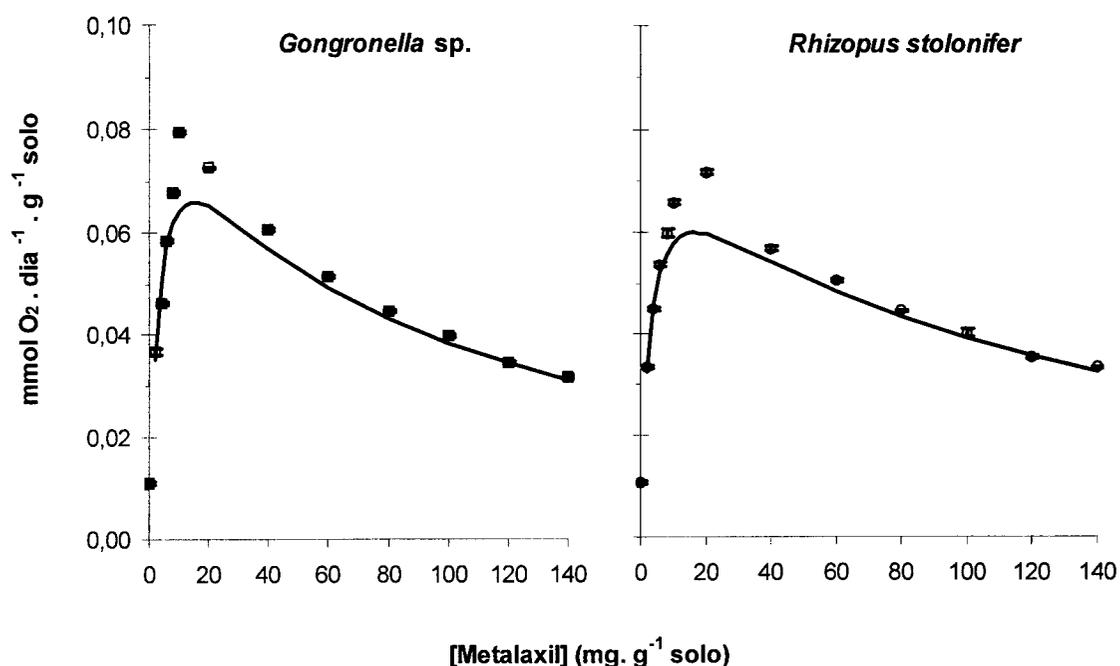


Figura 5.6– Relação entre as taxas de consumo de oxigénio e a concentração de metalaxil utilizada como principal fonte de carbono nos ensaios em solos na presença de *Gongronella sp.* e de *Rhizopus stolonifer*. Cada ponto experimental representa a média de 3 repetições. A linha contínua representa o modelo teórico de Haldane.

O procedimento utilizado para determinação dos parâmetros cinéticos foi idêntico ao descrito na **secção 4.3.3** do **capítulo 4**. Para concentrações não inibitórias de substrato, os valores de K_s e $T_{máx}$ foram determinados através dos métodos de linearização de Lineweaver-Burk, de Eadie - Hofstee e de Langmuir e, como não os valores obtidos foram semelhantes, foi calculado o valor médio. Para concentrações elevadas de substrato ($S \gg K_s$) os valores de $T_{máx}$ e K_i foram determinados através da representação de Dixon. Calculou-se também o valor de S_{mi} através da equação de Anderson. Os valores das constantes cinéticas (K_s , K_i , $T_{máx}$) são apresentados nas **tabelas 5.3 e 5.4**.

Tabela 5.3 – Valores das constantes cinéticas $T_{m\acute{a}x}$ (expressa em $\text{mmol O}_2 \cdot \text{dia}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ solo) e K_s (expressa em $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ solo) calculadas por três métodos de linearização para as estirpes de *Gongronella* sp. e *Rhizopus stolonifer* quando cultivadas no solo esterilizado na presença de metalaxil como principal fonte de carbono.

Estirpe	Métodos de Linearização	$T_{m\acute{a}x}$	K_s
		($\text{mmol O}_2 \cdot \text{dia}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ solo)	($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ solo)
<i>Gongronella</i> sp.	Lineweaver-Burk	0,0939	3,315
	Eadie – Hofstee	0,0980	3,316
	Langmuir	0,0991	3,318
<i>R. stolonifer</i>	Lineweaver-Burk	0,0815	2,950
	Eadie – Hofstee	0,0815	2,946
	Langmuir	0,0816	3,005

Tabela 5.4 – Valores das constantes cinéticas $T_{m\acute{a}x}$ e K_i e de S_{mi} para as estirpes de *Gongronella* sp. e *Rhizopus stolonifer* quando cultivadas no solo esterilizado na presença de metalaxil como principal fonte de carbono.

Estirpe	$T_{m\acute{a}x}$	K_i	S_{mi}
	($\text{mmol O}_2 \cdot \text{dia}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ solo)	($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ solo)	($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ solo)
<i>Gongronella</i> sp.	0,0953	69,437	15,174
<i>R. stolonifer</i>	0,0815	95,482	16,831

Observou-se que o metalaxil foi utilizado como substrato não inibitório até à concentração de 15,2 mg.g⁻¹ pela *Gongronella* sp. e até à concentração de 16,8 mg.g⁻¹ solo pelo *Rhizopus stolonifer*, tendo sido obtidos valores de K_s de 3,32 mg.g⁻¹ solo e de 2,96 mg.g⁻¹ solo, respectivamente (**Tabela 5.3**). O valor médio de $T_{máx}$ obtido para a *Gongronella* sp. oscilou entre 0,094 e 0,098 mmol O₂.dia.g⁻¹ solo consoante foi calculado através das linearizações da zona ascendente ou descendente do gráfico, respectivamente. O valor médio de $T_{máx}$ obtido para o *Rhizopus stolonifer* foi de 0,082 mmol O₂.dia.g⁻¹ solo (**Tabelas 5.3 e 5.4**). Os valores de K_i observados foram de 69,4 mg.g⁻¹ solo para a *Gongronella* sp. e de 95,5 mg.g⁻¹ solo para o *Rhizopus stolonifer* (**Tabela 5.4**).

O fungo *R. stolonifer* quando inoculado em amostras de solo apresentou valores de K_s inferior e de K_i superior aos obtidos para a *Gongronella* sp mostrando ter maior afinidade para o metalaxil e maior tolerância para concentrações elevadas de fungicida.

5.4. DISCUSSÃO

Neste capítulo foram apresentados os estudos realizados com o objectivo de avaliar a capacidade de adaptação dos microrganismos seleccionados quando adicionados ao solo, na presença e na ausência de população microbiana residente, simultaneamente, quantificar a capacidade de degradação do metalaxil por esses microrganismos.

Apesar de terem sido isolados a partir do solo em análise (solo A), estes microrganismos foram submetidos a um processo de selecção, sendo necessário avaliar a capacidade de adaptação dos microrganismos quando adicionados a amostras de solo com metalaxil, na presença e ausência de população residente, e avaliar a capacidade de degradação dos fungos adicionados.

Para determinar a viabilidade dos fungos seleccionados quando adicionados ao solo, como se trata de um processo de fermentação em estado sólido no qual é bastante difícil determinar directamente a biomassa, procedeu-se a uma avaliação semi-quantitativa do crescimento dos microrganismos existentes nas amostras de solo ao longo do tempo. Apesar das flutuações esperadas, pelo facto das amostras de solo não serem homogéneas e de nem todos os esporos inoculados serem viáveis, os resultados obtidos foram indicativos da proporção dos microrganismos existentes em cada momento e em cada amostra e permitiram confirmar que as estirpes inoculadas apresentaram capacidade para se adaptar e para se desenvolver no solo, quer na presença quer na ausência da população residente.

No estudo descrito no **capítulo 2** observámos que a população residente de um solo que tinha sido submetido a vários tratamentos com o fungicida comercial contendo metalaxil foi a que apresentou maior capacidade de degradar o metalaxil relativamente às populações de solos quimicamente semelhantes mas com diferentes históricos de aplicação desse fungicida. Estes resultados estão de acordo com os descritos por Bailey & Coffey (1986) para o metalaxil e por Newcombe & Crowley (1999) para a atrazina e que referem que a aplicação repetida destes pesticidas pode estar associada a uma maior capacidade de degradação desses produtos pela população residente desses solos. Outros autores referem que a capacidade de degradação de um fungicida no solo, para além da frequência de aplicação do fungicida, também pode ser bastante influenciada pelo tipo de solo na medida em que obtiveram valores de degradação do metalaxil bastante diferentes para solos que apresentavam conteúdos bastante diferentes nos minerais de argila (Papini & Andréa, 2001).

No presente estudo observamos que os fungos seleccionados após o enriquecimento selectivo quando adicionados a amostras de solos quer em cultura pura quer em cultura mista, foram capazes de utilizar o metalaxil como substrato e mostraram

capacidade para degradar quantidades significativas de metalaxil quer na presença quer na ausência da população residente. Após os 42 dias de incubação registou-se uma diminuição da percentagem de taxa de degradação, apesar de se ter observado degradação até aos 70 dias. Embora se tenha mantido a humidade da amostra, pode ter havido uma diminuição da população após este intervalo de tempo, talvez por uma diminuição da quantidade de oxigénio disponível, ou de outros reagentes limitantes ou ainda, acumulação de CO₂ no espaços entre as partículas do solo ou de metabolitos secundários formados durante o crescimento do micélio.

Dos três inóculos adicionados o que mostrou maior taxa de biodegradação do metalaxil foi o inóculo misto de *Gongronella* sp. e de *R. stolonifer* (1:1), embora os microrganismos em cultura pura também tenham apresentado taxas de degradação elevadas. Os microrganismos seleccionados apresentaram capacidade para biodegradar o metalaxil mais rapidamente do que a população residente, tendo-se obtido taxas de degradação superiores para as amostras de solo às quais foi adicionado o inóculo.

De acordo com alguns autores, a respiração microbiana é um parâmetro que pode ser utilizado para monitorizar a decomposição de poluentes no solo (Anderson, 1992), apesar de ser um factor altamente variável com o tipo de solo e condições de cultura e que pode apresentar uma grande flutuação consoante a disponibilidade do substrato, da solução e da temperatura do solo (Brookes, 1995).

No presente estudo utilizaram-se amostras do mesmo solo e mantiveram-se as condições de incubação, pelo que a determinação da taxa de consumo de oxigénio poderá dar-nos um valor de certo modo proporcional à biomassa existente (Pankrust *et al.*, 1998). Determinou-se a taxa de consumo de oxigénio para avaliação do aumento da biomassa microbiana uma vez que o processo em estudo se aproxima de uma fermentação em estado sólido, na qual é extremamente difícil separar a biomassa, como

já se referiu anteriormente. Nos processos de SSF na presença de xenobióticos, a determinação da taxa de consumo de O_2 que está a ser utilizado na oxidação de um composto poderá ser um bom indicador para avaliação da biomassa (Ooijkaas *et al.*, 1998; Pandey *et al.*, 2001).

No estudo cinético da *Gongronella* sp. e do *Rhizopus stolonifer* na presença de metalaxil observou-se que este composto se comportou como um substrato inibitório obedecendo ao modelo de Haldane (Beltrame *et al.*, 1980) à semelhança dos resultados obtidos em meio líquido descritos no **capítulo 4**. Para baixas concentrações de metalaxil, os microrganismos seleccionados conseguem utilizar este composto como substrato com aumento da taxa de consumo de oxigénio, tendo-se observado um aumento das taxas de consumo de oxigénio proporcional ao aumento da concentração de metalaxil. Para valores superiores aos valores de S_{mi} , o metalaxil passou a ter um efeito inibitório, com diminuição da taxa de consumo de oxigénio, a qual foi diminuindo lentamente com o aumento da concentração de metalaxil.

Muitas vezes, a mineralização completa de um poluente nos solos exige a interacção de vários grupos de microrganismos (consórcio) em que cada um é responsável por um passo de degradação (Bollag & Bollag, 1995; Turko & Sidney, 1995; Chen & Mulchandani, 1998). Esta interacção é extremamente positiva quando culturas puras, isoladas deste consórcio, não conseguem mineralizar completamente esse composto como única fonte de carbono ou quando a velocidade de degradação for mais baixa do que a obtida com a cultura mista que lhe deu origem (Chen & Mulchandani, 1998; Newcombe & Newcombe, 1999). Nos estudos apresentados, os resultados mostraram que embora tenha havido uma acção sinérgica quando os microrganismos foram adicionados às amostras de solo contendo população residente, observou-se uma taxa de degradação bastante significativa ($p < 0,01$) quando os microrganismos

seleccionados foram adicionados a amostras de solo previamente esterilizado em autoclave, ou seja, sem população residente.

Nos estudos efectuados os dois microrganismos seleccionados, *Gongronella sp.* e *Rhizopus stolonifer*, conseguiram aumentar significativamente a taxa de degradação do metalaxil ($p < 0,01$), embora a cultura mista das duas estirpes enriquecidas ainda tenha apresentado uma taxa de degradação superior às obtidas para as culturas puras.

Os resultados mostraram que as duas estirpes seleccionadas podem usar o metalaxil como substrato no solo e que a capacidade das estirpes para remover o metalaxil foi potenciada pela exposição prévia ao fungicida. Os baixos valores de K_s indicam uma elevada afinidade dos microrganismos para o metalaxil, pelo que a degradação do metalaxil pelas estirpes de *Gongronella sp.* e de *R. stolonifer* pode ter um potencial de aplicação prático como meio de redução do tempo de meia-vida deste fungicida nos solos. Apesar do efeito inibitório, as estirpes de *Gongronella sp.* e de *Rhizopus stolonifer*, mesmo em concentrações elevadas de fungicida, conseguiram degradar quantidades significativas de metalaxil e utilizar o metalaxil como substrato, podendo ser importantes no processo de biorremediação do metalaxil nos solos.

CAPÍTULO 6

Conclusões

A biodegradação de xenobióticos em solos contaminados pode ser um processo eficaz para os remover *in situ*, pelo que é importante seleccionar microrganismos que apresentem capacidade de resistir a altas concentrações destes compostos e que, simultaneamente, possuam capacidade para os degradar.

A elevada solubilidade do metalaxil e a fácil percolação nos solos é frequentemente referida como uma preocupação devido à probabilidade deste fungicida poder contaminar os sistemas aquíferos, pelo que, se torna importante removê-lo do solo e definir uma estratégia de biorremediação para este fungicida.

Neste trabalho, como já referimos, os estudos foram efectuados com o objectivo principal de identificar microrganismos activos no processo de degradação do metalaxil e de seleccionar as estirpes fúngicas que apresentarem melhores cinéticas de

biodegradação do fungicida e, susceptíveis de, no futuro, poderem vir a ser utilizadas na biorremediação de solos contaminados com metalaxil.

Dos estudos elaborados no presente trabalho, descritos e discutidos nos capítulos anteriores desta dissertação, foi possível retirar as conclusões finais que a seguir se descrevem.

Os estudos de degradação em solos previamente submetidos a diferentes índices de exposição aos fungicidas metalaxil e folpete, mostraram que:

- os solos submetidos a aplicações repetidas destes fungicidas durante vários anos adquiriram capacidade para degradar mais facilmente esses fungicidas do que solos semelhantes do ponto de vista físico-químico, que nunca tinham sido submetidos à exposição prévia a estes fungicidas;
- o solo que apresentou maior biodegradação foi o solo de vinha que tinha sido submetida a um número superior de tratamentos com os fungicidas (solo A);
- o processo de degradação do metalaxil e do folpete no solo foi essencialmente um processo biótico, uma vez que os solos sem população residente degradaram quantidades muito baixas relativamente às amostras com população residente, embora no caso do folpete a quantidade degradada por via abiótica tivesse sido mais elevada do que para o metalaxil;
- os estudos de variância das taxas de degradação no solo, obtidas para uma dada concentração de fungicida comercial em estudo, mostraram diferenças significativas na degradação do metalaxil e do folpete em função do tipo de amostra de solo com a população residente, no entanto, essas diferenças não se observaram no estudo equivalente efectuado na ausência de microrganismos;

- as diferenças na capacidade de degradação dos fungicidas poderão ter sido devidas à variabilidade da população microbiana (quer em quantidade quer em diversidade) que interveio na degradação do metalaxil e do folpete, sugerindo uma especialização desta população à medida que aumenta o número de tratamentos da cultura com os fungicidas.

Dos fungos isolados do solo com maior capacidade de biodegradação (solo A) foram seleccionados *Gongronella* sp. e *Rhizopus stolonifer* por terem apresentado capacidade para tolerar concentrações elevadas de metalaxil nos ensaios de enriquecimento e selecção de estirpes.

Nos estudos de degradação, em meio aquoso, constatou-se que:

- na presença de metalaxil, os microrganismos seleccionados, *Rhizopus stolonifer* e *Gongronella* sp., apresentaram capacidade para degradar quantidades significativas do fungicida, quer na presença quer na ausência de uma fonte adicional de carbono;
- na presença de folpete, os microrganismos seleccionados apresentaram capacidade para degradar quantidades elevadas deste fungicida e conseguiram utilizá-lo como fonte de carbono, no entanto, a degradação abiótica foi elevada;
- o folpete foi rapidamente degradado em solução aquosa, na ausência e na presença dos microrganismos, com formação de ftalimida como metabolito principal;
- os fungos seleccionados conseguiram utilizar e degradar o metalaxil mesmo após a sua fase exponencial de crescimento, tendo-se observado que a biomassa recolhida em fase estacionária continuou a apresentar capacidade para degradar o metalaxil;

- os fungos *Gongronella* sp. e *Rhizopus stolonifer* na presença de metalaxil como substrato limitante apresentaram um comportamento cinético de crescimento semelhante ao modelo de Haldane;
- ambos os microrganismos apresentaram um valor baixo de K_s na presença de metalaxil que funciona como substrato limitante e um valor de K_i relativamente elevado, indicando que os microrganismos seleccionados possuem capacidade de tolerar e degradar concentrações relativamente elevadas de metalaxil.

Os estudos de degradação nos solos, com os microrganismos seleccionados, mostraram que:

- os fungos *Gongronella* sp. e *Rhizopus stolonifer* quando inoculados em amostras de solos, isoladamente ou em cultura mista, apresentaram capacidade de adaptação em solos quer estes possuam ou não população residente;
- a taxa de degradação do metalaxil nas amostras de solo foi significativamente superior quando um dos fungos foi inoculado, apesar de se ter utilizado neste estudo, o solo que tinha apresentado maior capacidade para biodegradar o fungicida (solo A);
- o aumento das taxas de degradação nas amostras foi acompanhado por um aumento da frequência das estirpes inoculadas nos solos a qual foi muito superior à observada para as estirpes residentes dos solos;
- os fungos seleccionados pelo menos numa fase do crescimento utilizaram o metalaxil como fonte de carbono, conseguindo transformá-lo em biomassa com produção de O_2 ;

- os fungos *Gongronella* sp. e *Rhizopus stolonifer* inoculados em solos com metalaxil apresentaram um perfil de crescimento semelhante ao apresentado em meio líquido e seguem o modelo de Haldane para substratos inibitórios, tendo apresentado elevada afinidade para o metalaxil (baixos valores de K_s), pelo que a degradação do metalaxil pelas estirpes de *Gongronella* sp. e de *R. stolonifer* pode ter um potencial de aplicação prático como meio de redução do tempo de meia-vida deste fungicida nos solos.

O contributo mais relevante do presente trabalho foi possibilitar a utilização das estirpes identificadas como *Gongronella* sp. e *Rhizopus stolonifer* e isoladas após enriquecimento selectivo, por apresentarem capacidade para tolerar e degradar quantidades elevadas de metalaxil, em processos de biorremediação de solos contaminados com este fungicida e, assim, diminuir a sua persistência no solo e a consequente contaminação de águas subterrâneas.

Este trabalho veio colocar algumas questões que seria importante esclarecer em estudos futuros. Entre os estudos que seria importante realizar num trabalho futuro, salientam-se os seguintes:

- Confirmar se a espécie *Gongronella* sp., com capacidade para degradar o metalaxil, é uma nova espécie, uma vez que os estudos moleculares de agrupamento por MS-PCR, apresentaram diferenças superiores entre esta estirpe e as outras descritas para o género *Gongronella*. Um dos métodos que a utilizar seria a análise de restrição por ITS-ARDRA, uma vez que as zonas ITS são zonas muito conservadas que permitem fazer a diferenciação entre espécies. Uma outra hipótese, embora mais dispendiosa mas possível, se não se obtiverem resultados

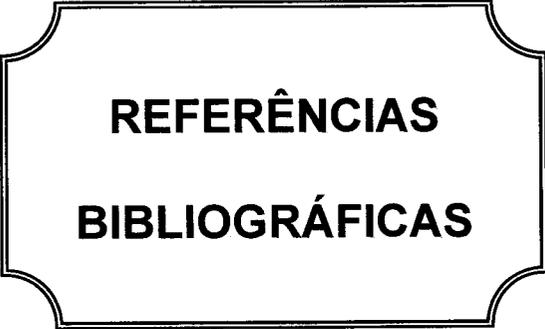
conclusivos com a análise de restrição, seria proceder à sequenciação das zonas ITS de cada uma das espécies padrão e da estirpe isolada. Como existem poucos microrganismos descritos neste género, talvez seja possível amplificar e purificar a zona do ITS das várias estirpes do género *Gongronella*, sequenciar cada uma dessas regiões ITS e proceder à comparação das sequências obtidas para cada um dos padrões com a da espécie que se pretende identificar, para avaliar se estamos na presença de uma espécie diferente.

- Optimizar o processo de produção dos microrganismos seleccionados em fermentador com vista à obtenção de uma quantidade significativa de biomassa e avaliar a relação custo/benefício da produção de cada uma das estirpes. Como nos estudos de degradação em solos se obtiveram bons resultados quer na utilização de um inóculo simples quer do inóculo misto, apesar deste ter apresentado uma taxa de degradação ligeiramente superior, é importante avaliar o seu custo de produção antes de se sugerir a utilização do inóculo misto, ou apenas um dos microrganismos seleccionados para posterior, aplicação nas condições de campo, na biorremediação de solos contaminados com o fungicida.
- Prosseguir os estudos de degradação para conhecer melhor o metabolismo do metalaxil nos fungos seleccionados. Como os estudos efectuados não permitiram identificar possíveis metabolitos formados, para melhor compreender o processo de degradação, seria importante, no futuro, efectuar estudos com o metalaxil marcado para poder correlacionar a quantidade de CO₂ libertada por eliminação do metalaxil, e, eventualmente identificar um possível metabolito recorrendo, por exemplo, a técnicas de HPLC com detector de radioisótopos e/ou detector de espectrometria de massa e, ainda, a técnicas de ressonância magnética nuclear.
- Desenvolver um estudo nas condições de campo, para confirmação dos resultados obtidos nos ensaios laboratoriais em solos com os microrganismos seleccionados,

uma vez que, o processo de biodegradação pode ser influenciado por factores físicos, químicos e ambientais. Um estudo interessante seria avaliar o processo de degradação do metalaxil *in situ*, à superfície do solo e, eventualmente, também em profundidade, porque o metalaxil é facilmente lixiviado nos solos. Para o efeito, seriam efectuados ensaios de campo numa área definida de um solo contaminado com metalaxil, onde os microrganismos seriam aplicados por pulverização, após ressuspensão dos liofilizados em água, tendo sempre o cuidado de controlar as condições de ensaio, embora os microrganismos adicionados sejam microrganismos isolados de amostras de solos que apenas foram submetidos a um processo de enriquecimento não se tratando, portanto de organismos geneticamente modificados.

Um estudo que também se poderia efectuar futuramente seria a avaliação da capacidade de degradação do metalaxil pelas estirpes seleccionadas, *Rhizopus stolonifer* e *Gongronella sp.*, noutros tipos de solos onde este composto seja utilizado frequentemente, para confirmar a sua capacidade de adaptação nesses solos.

Por outro lado, também seria interessante, avaliar a capacidade de degradação de outros pesticidas, quimicamente semelhantes ao metalaxil, pelas estirpes *Gongronella sp.* e *Rhizopus stolonifer* e determinar se alguma delas seria activa na biodegradação destes compostos em solos, podendo assim, as estirpes activas, serem aplicadas na biorremediação de solos contaminados não só com metalaxil mas também com outros xenobióticos de aplicação frequente e que poderão também ter efeitos nefastos para os seres vivos e/ou para o ambiente.



**REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

Referências Bibliográficas

- 📖 Aharonson, N., Katan, J., Avidov, E. & Yarden, O. (1990). The Role of Fungi and Bacteria in the Enhanced Degradation of the Fungicide Carbendazin and the Herbicide Diphenamid. In: *Enhanced Biodegradation of Pesticides in the Environment*, Racke, K.D. & Coats, J.R. (Eds.). A.C.S. Symposium Series nº 426, pp. 113-127 American Chemical Society, Washington, DC.
- 📖 Aislabie, J. & Lloyd-Jones, G. (1995). A Review of Bacterial Degradation of Pesticides. *Aust.J. Soil Res.*, **33**, 925-942.
- 📖 Akiyama, Y., Yoshioka, N & Tsuji, M. (1998). Studies on Pesticide Degradation Products in Pesticide Residue Analysis. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **39**, 303-309.
- 📖 Alexander, M. (1977). Introduction to Soil Microbiology, 2nd edition. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- 📖 Alexander, M. (1994). Biodegradation and Bioremediation. Academic Press, Inc., U.S.A.
- 📖 Amaro, P. (1991). O que é a protecção integrada e a necessidade de intensificar o seu desenvolvimento em Portugal. I Encontro Nacional de Protecção Integrada, pp.18-23. Universidade de Évora, Évora.
- 📖 Anderson, J.P.E. & Lafuerza, A. (1992). Microbial aspects of accelerated pesticide degradation. In: *Proceedings of the International Symposium on Environmental Aspects of Pesticide Microbiology*. Anderson, J.P.E, Arnold, D.J., Lewis, F. & Tortensson, L. (Eds.), pp. 184-192. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
- 📖 Anderson, J.P.E. (1987). Handling and storage of soils for pesticide experiments. In: *Pesticide Effects on Soil Microflora*. (Eds.) Somerville L. & Greaves M.P., pp. 45-61. Taylor & Francis, London.
- 📖 Anderson, T.A. & Coats, J.R. (1995). Un Overview of Microbial Degradation in the Rhizosphere and its implications for Bioremediation. In: *Bioremediation, Science and Applications*. SSSA, Special Publication nº 43, pp. 135-143. Soil Science Society of America, Madison.

- 📖 Andrades, M.S.; Sánchez-Martín, M.J. & Sánchez-Camazano, M. (2001). Significance of soil properties in the adsorption and mobility of the fungicide metalaxyl in vineyard soils. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 2363-2369.
- 📖 Andrews, J.F. (1968). A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. *Biotechnol. Bioeng.*, **10**, 707-723.
- 📖 Anne, P. (1945). Sur le dosage rapide du carbone organique des sols. *Ann. Agron.* **15**, 161:172.
- 📖 Anselmo, A.M. (1992). Estudo da degradação de fenol por células livres e imobilizadas de *Fusarium flocciferum*. Tese de doutoramento, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa.
- 📖 Arnold, D.J. & Briggs, G.G. (1990). Fate of Pesticides in Soil: predictive and practical aspects. In: *Environmental Fate of Pesticides*. Hutson, D.H. & Roberts, T.R. (Eds.). Progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, Vol. 7, pp. 102-122. John Wiley & Sons, Chichester, England.
- 📖 Aube, C. & Gagnon, C. (1971). Fungi and their ecology in a soil seeded with red clover. *Can. J. Microbiol.*, **17**, 921-927.
- 📖 Aylmore, L.A.G. & Di, H.J. (2000). Predicting the probabilities of groundwater contamination by pesticides under variable recharge. *Aust. J. Soil Res.* **33**, 1031-1040.
- 📖 Bailey, A.M. & Coffey, M.D. (1985). Biodegradation of Metalaxyl in Avocado Soils. *Disease Control and Pest. Management*, **75**, 135-137.
- 📖 Bailey, A.M. & Coffey, M.D. (1986). Characterization of Microorganisms involved in accelerated biodegradation of Metalaxyl and Metolachlor in Soils. *Can. J. Microbiol.*, **32**, 562-564.
- 📖 Bailey, J.E. & Ollis, D.F. (1986). *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd edition. McGraw-Hill, New York.
- 📖 Ballantine, L.G. & Simoneaux B.J. (1991). Pesticides Metabolites in Food. In: *Pesticides Residues and Food Safety*. Tweedy, B.G., Dishurger, H.J., Ballantine, L.G., McCarthy, J. & Murphy, J. (Eds.), cap. 11, pp 96-113. American Chemical Society, Washington, D.C.

-
- 📖 Beltrame, P.; Beltrame, P.L. & Carniti, P. (1980). Use of the Haldane Equation for Steady-State Substrate Inhibition in Biodegradation Kinetics. *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 2405-2409.
- 📖 Bending, G.D.; Friloux, M. & Walker, A. (2002). Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential. *FEMS Microbiology Letters*, **212**, 59-63.
- 📖 Bennett, D. (1990). Evaluation of the Fate of Pesticide in Water and Sediment In *Environmental Fate of Pesticides*. Hutson, D.H. & Roberts, T.R. (Eds.), Progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, Vol. 7, pp.149-174. John Wiley & Sons, New York.
- 📖 Berezin, P.N. & Voronin, A.D. (1982). Use a Sedigraph for the particle size analysis of soils. *Soviet Soil Science*, **13**, 101-109.
- 📖 Bollag, J.-M., Bollag, W.B. (1995). Soil contamination and the feasibility of Biological Remediation. In: *Bioremediation, Science and Applications*. SSSA, Special Publication nº 43, pp. 1-12. Soil Science Society of America, Inc. Madison.
- 📖 Bordjiba, O., Steiman, R., Kadri, M, Semadi, A & Guiraud, P. (2001). Removal of Herbicides from Liquid Media by Fungi Isolated from Contaminated Soil. *J. Environ. Quality*, **30**, 418-426.
- 📖 Brady, N.C. & Weil, R.R. (1999). The Nature and Properties of Soils, 12th edition. Prentice Hall, New Jersey.
- 📖 Brantner, J.R. & Windels, C.E. (1995). Variability in Sensitivity to Metalaxyl in vitro, Pathogenicity and Control of *Phythium* spp. on Sugar Beet. *Plant Disease*, **82**, 896-899.
- 📖 Bremner, J.M. & Mulvaney, C.S. (1982). Nitrogen Total. In: *Methods of Soil Analysis. Part2. Chemical and Microbial Properties*. Page, A.L, Miller, R.H. & Keeney, D.R. (Eds.) Agronomy Monograph nº 9, 2nd edition, pp. 595-624. American Society of Agronomy, Madison, USA.
- 📖 Brower, E.J. & Zehnder, A.J.B. (1993). Bioremediation of organic compounds – putting microbial metabolism to work, *Trends in biotechnology*, **11**, 360-367.
- 📖 Brown, C.D., Carter, A.D. & Hollis, J.M. (1995). Soils and Pesticide mobility. In: *Environmental Behaviour of Agrochemicals*. Roberts, T.R. & Kearney, P.C. (Eds.),
-

- Progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, Vol. 9, pp. 131-184. John Wiley & Sons, Chichester, England.
- 📖 Bryman, A. & Cramer, D. (2001). Quantitative Data Analysis with SPSS for Windows: A Guide for Social Scientists. Rutledge, United Kingdom.
- 📖 Buchan, G. D., Grewal, K.S., Claydon, J.J. & McPherson, R.J. (1993). A Comparison of Sedigraph and pipette methods for particle-size analysis. *Australian Journal of Soil Research*, **31**, 407-417.
- 📖 Buscot, F.; Wipf, D.; Battista, C.E.; Munch, J-C; Botton, B. & Martin F. (1996). DNA polymorphism in morels: PCR/RFLP analysis of ribosomal DNAspacers and microsatellite-primed PCR. *Mycology Res.*, **100**, 63-71.
- 📖 Businelli M., Patumi, M., Marucchini, C. (1984). Identification and determination of some metalaxyl degradation products in lettuce and sunflower. *J. Agric Food Chem.*, **32**, 644-646.
- 📖 Cabras, P. & Angioni, A. (2000). Pesticide Residues in Grapes, Wine and their processing Products. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 965-973.
- 📖 Cabras, P.; Angioni, A.; Garau, V.L.; Melis, M.; Pirisi, F.M.; Farris, G.A.; Sotgiu, C. & Minelli, E.V., (1997). Persistence and Metabolism of Folpet in Grapes and Wine. *J. Agric. Food Chemistry*, **45**, 476-479.
- 📖 Caetano-Anollés, G & Gresshoff, P. (1997) DNA Markers. Protocols, Applications and Overviews. Wiley-VCH, New York.
- 📖 Campbell, R.L. & Langford, R.E. (1991). Fundamentals of Hazardous Material Incidents, 2nd edition. Lewis Publishers, Michigan.
- 📖 Caplan, J.A. (1993). The worldwide bioremediation industry: prospects for profit. *Trends in Biotechnology*, **11**, 320-323.
- 📖 Cardoso, J.V.J.C. (1965). Os solos de Portugal. Sua classificação, caracterização e génese. 1- A Sul do rio Tejo. Direcção Geral dos Serviços Agrícolas, Secretaria de Estado da Agricultura, Lisboa.
- 📖 Carter, A.D. & Heather, A.I.J. (1995). Pesticides in Groundwater. In: *Pesticides – Developments, Impacts, and Controls*. Best, G. & Ruthven, D. (Eds.), pp. 62-73. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.

-
- 📖 Carter, M.R. (1993). *Soil Sampling and Methods of Analysis*. Canadian Society of Soil Science, Lewis Publishers, CRC Press Inc., USA.
- 📖 Cerejeira, M.J. (1993). Estudo da distribuição e destino final dos pesticidas no ambiente numa abordagem integrada. Caso da atrazina na Zona Agrária da Chamusca. Dissertação para obtenção do Grau de Doutor, Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.
- 📖 Chaîneau, C.H., Morel, J., Dupont, J., Bury, E. & Oudot, J. (1999). Comparison of the fuel oil biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating microorganisms isolated from a temperate agricultural soil. *Sci of the Total Environ.*, **227**, 237-247.
- 📖 Chen, W. & Mulchandani, A. (1998). The use of live biocatalysts for pesticide detoxication. *Trends in Biotechnology*, **16**, 71-76.
- 📖 Cheng, H.H. (1990). *Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts, and Modelling*. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin.
- 📖 Christen, P.; Bramorski, A., Revah, S. & Socol, C.R. (2000). Characterization of volatile compounds produced by *Rhizopus* strains grown on agro-industrial solid wastes. *Bioresource Technol.*, **71**, 211-215.
- 📖 Cohen, S.Z. (1990). Pesticides in ground water: an overview. In: *Environmental Fate of Pesticides*. Hutson, D.H. & Roberts, T.R. (Eds.), Progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, Vol. 7, pp.13-26. John Wiley & Sons, New York.
- 📖 Cole, D.J. & Owen, W.J. (1987). Metabolism of metalaxyl in cell suspension cultures of *Lactuca sativa* L. and *Vitis vinifera* L. *Pestic Biochem Physiol.*, **28**, 354-361.
- 📖 Coleman, D.C. & Crossley, Jr, D.A. (1996). *Fundamentals of Soil Ecology*. Academic Press Inc., USA.
- 📖 Copeland, R. A. (2000). *Enzymes – A Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis*, 2nd edition. Wiley-VCH, New York
- 📖 Correia A.A.D. (1982). *Bioquímica nos solos, nas pastagens e forragens*. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
- 📖 Costa, A.S.V. (1984). Elementos sobre Fertilidade do solo e Fertilização. *Solos e Água* nº 1 Ministério da Agricultura, Florestas e Alimentação.

- 📖 Costa, J.B.. (1979). Caracterização e Constituição do solo, 2ª edição. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
- 📖 Cremlyn, R.J. (1991). Agrochemicals. Preparation and Mode of Action. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester.
- 📖 Crépin, J. & Johnson R.L. (1993). Soil Sampling for environmental Assessment. In: *Soil Sampling and Methods of Analysis*. Carter, M.R. (Ed.), pp. 5-18. Canadian Society of Soil Science, Lewis Publishers, CRC Press Inc., USA.
- 📖 Dahnke, W.C. (1971). Use of the nitrate specific ion electrode in soil testing. *Soil Sci. Plant Analítica*, **2**, 73-84.
- 📖 Davison, E. & McKay, A. (2000). Reduced Persistence of Metalaxyl in Carrot Soil. *How Degrading*, CSIRO Entomology, **2**, 2.
- 📖 DGPC (2001). Guia dos Produtos Fitofarmacêuticos. Limites Máximos de Resíduos de Produtos Fitofarmacêuticos Autorizados em Portugal. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, Direcção Geral de Protecção das Culturas, Oeiras.
- 📖 Di, H.J. & Aylmore, L.A.G. (1997). Modelling the Probabilities of Groundwater Contamination by Pesticides. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **61**, 17-23.
- 📖 Di, H.J., Aylmore, L.A.G. & Kookana, R.S. (1998). Degradation Rates of Eight Pesticides in Surface and Subsurface soils under Laboratory and Field Conditions. *Soil Sci.*, **163**, 404-411.
- 📖 Di, H.J., Kookana, R. S. & Aylmore, L.A.G. (1995). Application of a single model to assess the groundwater contamination potential of pesticides. *Aust. J. Soil Res.*, **33**, 1031-1040.
- 📖 Directiva comunitária n ° 42 (2000). Maximum levels for pesticide residues. *Official Journal of the European Communities*, L 158, 51-75.
- 📖 Domsch, K.H.; Gams, W. & Anderson, T.H. (1980). Compendium of Soil Fungi. Academic Press, London.
- 📖 Doran, P. M. (2000). Bioprocess Engineering Principle, 5th printing. Academic Press Limited, U.S.A.

-
- 📖 Egli, T.W. (1992). General strategies in the biodegradation of pollutants. In: *Metal Ions in Biological Systems. Degradation of Environmental Pollutants by Microorganisms and their Metalloenzymes*. Siegel, H. & Siegel, A. (Eds.), pp. 1-39. Marcel Decker, Inc., New York.
- 📖 Eke, K.R., Barnden, A.D. & Tester, D. (1996). Impact of Agricultural Pesticides on Water quality In: *Issues in Environmental Science and Technology*. Hester, R.E & Harrison, R.M (Eds.), Vol.5, pp.43-56. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- 📖 Ellis, M.A., Grove, G. G. & Feree, D.C. (1982). Effects of metalaxyl on *Phytophthora cactorum* and collar rot of apple. *Phytopathology*, **72**, 1431-1440.
- 📖 EPA (1987). Pesticide Fact Sheet Number 215: Folpet. U.S. Environmental Protection Agency Office of Pesticides and Toxic Substances, Office of Pesticide Programs, Washington, DC.
- 📖 EPA, (1994). Registration eligibility decision (R.E.D.): Metalaxyl. EPA 738-R-94-017. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- 📖 EPA, (1999a) Registration eligibility decision (R.E.D.): Folpet. EPA 738-R-99-011. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- 📖 EPA, (1999b) R.E.D. FACTS: Folpet. EPA 738-F99-016. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- 📖 Erlich, H.A. (1989). PCR Technology. Principles and Analysis. Macmillan Stockton Press, USA.
- 📖 Extoxnet, (1995). Pesticide information profile: Folpet. Extension Toxicology Network. Oregon State University.
- 📖 Extoxnet, (1996). Pesticide information profile: Metalaxyl. Extension Toxicology Network. Oregon State University.
- 📖 FAO/WHO (1991). Folpet in Pesticide Residues in Food: Toxicology Evaluations. In: *FAO Plant Production and Protection Paper*, pp. 69-80. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Geneva.
- 📖 FAO/WHO (1996). Metalaxyl - Pesticide Residues in Food-1995. Part I-Residues In: *FAO Plant Production and Protection Paper 137*, pp. 507. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
-

- FAO/WHO (1998). Folpet. In: *WHO Pesticides Residues Series 4*, Document 041, pp. 639-684. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Ferrando, M.D., Sancho, E., Andreu-Moliner, E. (1996) Accumulation of Tetradifon in Algae (*Nannochloris oculata*) and the Cladoceran, *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **57**, 139-145.
- Fontem, D.A. & Aighewi, B. (1993). Effect of fungicides on late blight control and yield loss of potato in the Western highlands of Camerron. *Int. J. Pest Manage*, **32**, 152-155.
- Fuhremann, T.W (1991). Food Safety Assessment for Various Classes of Carcinogens. In: *Pesticides Residues and Food Safety. A Harvest of Viewpoints*. Tweedy, G., Ballantine, L.G., McCarthy, J. & Murphy, J. (Eds.), pp 221-225. American Chemical Society, Washington, DC.
- Gad, M.G. (1986). Toxicity Screening using Fungi and Yeasts. In: *Toxicity Testing using Microorganisms*. Dutka, B.J. & Bitton, G. (Eds.), pp. 44-72. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Germida, J.J. (1993). Cultural Methods for Soil Microorganisms. In: *Soil Sampling and Methods of Analysis*, ed. Carter, M.R., pp. 263-276. Canadian Society of Soil Science, Lewis Publishers, CRC Press Inc., USA.
- Gerzabeck, M.H. (1992). Determination of soil texture using the Sedigraph 5100 and Master Tech automatic sampler. Manual OEFZS – Bericht n° 4649.
- Glaser, J.A & Lamar, R.T. (1995). Lignin-Degrading Fungi as Degraders of Pentachlorophenol and Creosote in Soil. In: *Bioremediation, Science and Applications*. SSSA, Special Publication n° 43, pp. 117-133. Soil Science Society of America, Madison.
- Greenberg, A. E., Clesceri, L.S. & Eaton, A.D. (1992). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18th edition. APHA, AWWA, WEF. USA.
- Griffiths, A.J.F, Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C. e Gelbart, W. M. (2000). An Introduction to Genetic Analysis, 7th edition. W.H. Freeman and Company, New York.
- Gross, D. (1986). Uptake, translocation and metabolism of metalaxyl in higher plants. Proceedings of the 6th International Congress on Pesticide Chemistry, Otawwa.

-
- 📖 Gualco, A. & Togni, S. (2001). Folpet: present situation and usage perspectives. *Informatore Fitopatologico*, **51**, 55-58.
- 📖 Guimarães, R. C. & Cabral, J. A. S. (1997). *Estatística*. McGraw-Hill, Porto.
- 📖 Guzzella, L., DePaolis, A., Bartone, Z., Pozzoni, F. & Giulliano, G. (1996). Migration of Pesticides Residues from Agricultural Residues from Agricultural soil Groundwater, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **65**, 261-275.
- 📖 Haldane, J.H.S. (1930). In: *Enzymes*. (Longmans, Green, London). M.I.T. Press, Cambridge, Massachusetts, pp. 84.
- 📖 Harder, W. (1981). Enrichment and Characterization of degrading organisms. In: *Microbial Degradation of Xenobiotics and Recalcitrant Compounds*. Leisinger, T., Cook, A.M., Hütter, K. & Niesch, J. (Eds.), pp. 77-96. Academic Press, London.
- 📖 Harris, R.F. & Arnold, S.M. (1995). Redox and Energy Aspects of Soil Bioremediation. In: *Bioremediation. Science and Applications*. SSSA, Special Publication n° 43, pp.55-86. Soil Science Society of America, Madison.
- 📖 Hart, M.R. & Brokes, P.C. (1992). Effects of Pesticides on the Soil Microbial Biomass and Microbial Activity. In: *Proceedings of the International Symposium on Environmental Aspects of Pesticide Microbiology*. Anderson, J.P.E.; Arnold, D.J.; Lewis F. & Tortensson, L. (Eds.) pp.105. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
- 📖 Hassall, K.A. (1990). *The biochemistry and uses of pesticides*, 2nd edition. VCH Publishers, New York.
- 📖 Heitzer, A. & Sayler, G.S. (1993). Monitoring the efficacy of bioremediation. *Trends in Biotechnology*, **11**, 334-343.
- 📖 Hendershot, W.H.; Lalonde, H. e Duquette, M. (1993). Soil Reaction and Exchangeable Acidity. In: *Soil Sampling and Methods of Analysis*. Carter, M.R. (Eds.), pp. 141-145. Canadian Society of Soil Science, Lewis Publishers, CRC Press Inc., USA.
- 📖 Hill, G.A. & Robinson, C.W. (1975). Substrate inhibition kinetics: phenol degradation by *Pseudomonas putida*. *Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 1599-1615.

- 📖 Horst, G.L., Shea P.J., Christians N., Miller, D.R., Stuefer-Powell C., Starrett S.K. (1996). Pesticide dissipation under golf course fairway conditions. *Crop Science*, **36**, 362-370.
- 📖 Hrelia, P., Maffei, F., Fimognari, C., Vigagni, F. & Cantelli-Forti, G. (1996). Cytogenetic effects of Metalaxyl on human and animal chromosomes. *Mutation Research*, **369**, 81-86.
- 📖 James E.T.(1998). Protecting Honey Bees From Pesticides. *Alabama Corporative Extension System ANR-1088*. Ohio State University. U.S. Department of Agriculture.
- 📖 Júlio, E. (2001). Guia de Protecção Fitossanitária da Vinha. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, Direcção Geral de Protecção das Culturas, Oeiras.
- 📖 Kaneko, H., Isobe, N. & Miyamoto, J. (1995). Metabolism of fungicides in mammals. In: *The Mammalian Metabolism of Agrochemicals*. Hutson, D.H. & Paulson, G.D. (Eds.), Progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, Vol. 8, pp. 197-266. John Wiley & Sons, Chichester, England.
- 📖 Kerkenaar, A. & Sijpestijin, A.K. (1981). Antifungal activity of metalaxyl and fluraxyl. *Pest. Biochem.Physiol.*, **15**, 71-78.
- 📖 Killham, K. (1996). Soil ecology. Cambridge University Press, United Kingdom.
- 📖 Kjeldahl, J. (1883). Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. *Z. Anal. Chem.*, **22**, 366-382.
- 📖 Kookana, R.S., Di H.j., Aylmore, L.A.G. (1995). A field study of leaching and degradation of nine pesticides in a sandy soil. *Australian Journal Soil Research*, **33**, 1019-1030.
- 📖 Koskinen, W.C e Harper, S.S. (1990). The retention Process: Mechanisms. In: *Pesticides in Soil Environment: Processes, Impacts, and Modeling*. Cheng, H.H. (Ed.), pp. 51-73. Soil Science Society of America, Madison WI.
- 📖 Krieg, N.R. & Holt, J.G (1984). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore.
- 📖 Kudsen, D. (1975). Recommended Phosphorus tests for North Central Region North Central Regional Publication, **221**, 14-16.

- 📖 Kunz, D.A.; Silva-Avalos, J. & Delong, G.T. (1992). Utilization of cyanide as a nitrogen substrate by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764. *Appl. Environm.. Microbiol.*, **58**, 2022-2029.
- 📖 Lanfranco, L., Peroto, S, Longato, S., Mello, A., Cometti, V. & Bonfante, P. (1998). Molecular approaches to investigate biodiversity in mycorrhizal fungi. In: *Mycorrhiza Manual*. Varma, A. (Ed.), pp. 353-372. Springer, Berlin.
- 📖 Langemaat, J.; Pyle, D.L. (2001). Solid-state fermentation and bioremediation: development of a continuous process for the production of fungal tannase. *Chem. Engin. J.*, **12**, 115-123.
- 📖 Legrand, M.F., Costentin, E., Bruchet, A. (1991). Occurrence of 38 pesticides in various French surface and ground water. *Environ. Technology*, **12**, 985-996.
- 📖 Lenhard, R.J., Skeen, R.S. & Brouns T.M. (1995). Contaminants at U.S. DOE Sites and their Susceptibility to Bioremediation. In: *Bioremediation, Science and Applications*. SSSA, Special Publication n° 43, 157-172. Soil Science Society of America, Madison.
- 📖 Libra, J.A., Kyoung, S.R., Chung, K.H. & Chung, Y.C. (1996). Pesticides and Herbicides. *Water Environmental Research*, **68**, 564 –568.
- 📖 Liu, S. & Suflita, J.M. (1993). Ecology and evolution of microbial populations for bioremediation. *Trends in biotechnology*, **11**, 344-352.
- 📖 Longato, S & Bonfante, P. (1997). Molecular identification of mycorrhizal fungi by direct amplification of microsatellite regions. *Mycol. Res.*, **101**, 425-432.
- 📖 Madden, L.V. & Ellis, M. A. (2000). Evaluation of a disease warning system for downy mildew grapes. *Plant Disease*, **84**, 549-554.
- 📖 Malloch, D. (1981). *Moulds, their identification, cultivation and identification*. University of Toronto Press.
- 📖 Maroco, J. (2003). *Análise Estatística. Com utilização do SPSS*. Edições Silabo, Lisboa.
- 📖 Martens, D. A. & Bremner, J. M. (1997). Inhibitory Effects of Fungicides on Hydrolysis of Urea and Nitrification of Urea Nitrogen in Soil. *Pest Sci*, **49**, 344-352.

- 📖 Martin F., Costa, G., Delarruelle, C. & Diez, J. (1998). Genomic Fingerprinting of Ectomycorrhizal Fungi by Microsatellite-Primed PCR. In: *Mycorrhiza Manual*. Varma, A. (Ed.), pp. 463-474. Springer, Berlin.
- 📖 Martin, M., Ferrer, E., Alonso, R. & Fernandez, J. (1995). Bioremediation of Soil Contaminated by Propachlor Using Native Bacteria. *Int. Biodeterior. Biodeg.*, **35**, 213-225.
- 📖 Martin, M., Mengs, G., Allende, J.L., Fernandez, J., Alonso, R., & Ferrer, E (1999). Characterization of Two Novel Propachlor Degradation Pathways in Two Species of Soil Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 802-806.
- 📖 Matheron, M.E. & Porchas, M (2000). Impact of Azoxystrobum, Dimethromorph, Fluazinam, Fosetyl-Al and Metalaxyl on Growth, Sporulation and Zoospore Cyst Germination of the three *Phytophthora* spp.. *Plant Disease*, **84**, 454-458.
- 📖 Matsumara, F. (1982). Degradation of Pesticides in the Environment by Microorganisms and Sunlight. In: *Biodegradation of Pesticides*. Matsumura, F. & Murti, C.R.K.(Eds.), pp. 67-85. Plenum Press, New York.
- 📖 McLoughlin, T.J., Alt, S.G. & Merlo, P.A. (1990) Persistence of Introduced *Bradyrhizobium japonicum* strains in forming nodules in subsequent years after inoculation in Wisconsin soils. *Can. J. Microbiol.*, **36**, 974-800.
- 📖 Merck & Co (1996). The Merck Index. An encyclopedia of chemicals, drugs and biological products, twelfth edition, pp. 716, 987. Published by Merck Research Laboratories Division of Merck & Co Inc., White House Station, N.J., U.S.A.
- 📖 Meyer, W. & Mitchell, T.G: (1995). Polymerase Chain Reaction Fingerprinting in Fungi using Single Primers Specific to Microsatellites and Simple Repetitive DNA sequences: Strain Variation in *Cryptococcus neoformans*. *Electroforesis*, **16**, 1648-1656.
- 📖 Meyer, W., Koch A., Niemann, C., Beyermann, B., Epplen, J.T. & Borner, T. (1991). Differentiation of Species and Strains Among Filamentous Fungi by DNA Fingerprinting. *Curr. Genet.*, **19**, 239-242.
- 📖 Micromeritics (1988). Sedigraph 5100, Particle Size Analysis System, Operators manual. Micromeritics Instrument Corporation. Norcross.
- 📖 Millburn, P. (1995). The fate of xenobiotics in mammals: biochemical process In: *The Mammalian Metabolism of Agrochemicals*. Hutson, D.H. & Paulson, G.D. (Eds.),

- Progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, Vol. 8, pp. 1-86. John Wiley & Sons, Chichester, England.
- 📖 Miller, R.M. (1995). Surfactant-Enhanced Bioavailability of Slightly Soluble Organic Compounds. In: *Bioremediation, Science and Applications*. SSSA, Special Publication nº 43, pp. 33-54. Soil Science Society of America, Madison.
- 📖 Mitchell, R. (1993). *Environmental Microbiology*. Wiley-Liss Inc, New York
- 📖 Miyamoto, J., Mikami, N. e Takimoto, Y. (1990). The fate of pesticides in aquatic ecosystems. In: *Environmental Fate of Pesticides*. Hutson, D.H. & Roberts, T.R., (Eds.), Progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, Vol. 7, pp. 123-142. John Wiley & Sons, Chichester, England.
- 📖 Mohapatra, S. & Awasthi, M.D., (1997). Enhancement of Metalaxyl Degradation by Synergist Interaction among Bacterial and Fungal Isolates. *Pesticide Research Journal*, **9**, 62-66.
- 📖 Monkiédjé, A., Njiné, T., Tamatcho, B. & Démanou, J. (2000). Assessment of the Acute Toxic Effects of the Fungicide Ridomil plus 72 on Aquatic Organisms and Soil Micro-Organisms. *Environ. Toxicol.*, **15**, 65-70.
- 📖 Monod, J. (1942). *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*, Hermannet Cie, Paris, 1942.
- 📖 Moorman, T.B. (1994). Pesticide Degradation by Soil Microorganisms: Environmental, Ecological, and Management Effects. In: *Soil Biology: Effects on Soil Quality*. Hatfield, J.L. & Stewart, B.A. (Eds.). Lewis Publishers, USA.
- 📖 Murthy, N.B.K., Hurstert, K, Moza, P.N & Kettrup, A. (1998). Photodegradation of selected fungicides on soil. *Fresenius Envir. Bull.* **7**, 112 – 117.
- 📖 Murti, C.R. & Dikshith, T.S.S. (1982). Application of Biodegradable Pesticides in Índia. In: *Biodegradation of Pesticides*. Matsumura, F. & Murti, C.R.K. (Eds.), pp. 257-294. Plenum Press, New York.
- 📖 Nagel, F.J., Ooosra, J., Tramper, J. & Rienzema, A. (1999). Improved model system for solid-substrate fermentation: effects of pH, nutrients and buffer on fungal growth rate. *Process Biochemistry*, **35**, 69-75.

- 📖 Navarro, S., Oliva, J., Navarro G. & Barba, A. (2001). Dissipation of Chlorpyrifos, Fenarimol, Mancozeb, Metalaxyl, Penconazole, and Vinclozolin in Grapes. *Am. J. Enol. Vitic.*, **52**, 35-40.
- 📖 Nelson, D.W. & Sommers, L.E. (1982). Total Carbon, Organic Carbon and Organic Matter. In: *Methods of Soil Analysis. Part2. Chemical and Microbial Properties*. Page, A.L, Miller, R.H. & Keeney, D.R (Eds.). Agronomy Monograph n° 9, 2nd edition, pp. 539-580. American Society of Agronomy, Madison, USA
- 📖 Newcombe, D.A. & Crowley, D.E. (1999). Bioremediation of atrazine-contaminated soil by repeated applications of atrazine-degrading bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**, 877-882.
- 📖 Nimmo, D.R. (1985). Pesticides. In: *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Rand, G.M. & Petrocelli, S.R. (Eds.), pp. 335-373, Hemisphere, Washington, DC.
- 📖 Novack, J.M., Jayachandran, K., Moorman, T.B. & Weber, J.B. (1995). Sorption and Binding of Organic Compounds in Soils and Their Relation to Bioavailability. In: *Bioremediation, Science and Applications*. SSSA Special Publication n° 43, pp. 13-31. Soil Science of America, Madison.
- 📖 Nuninger, C., Watson, G., Leadbitter, N. & Ellgehausen, H.(1996). CGA 329351. Introduction of the enantiomeric form of the fungicide metalaxyl. *Proceedings of the British Crop Protection Conference: Pest and disease*, Brighton, **1**,41-46.
- 📖 O'Brein, R.G. & Weinert, M.P. (1995). Three metalaxyl sensitivity levels in Australian isolates of *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. et Curt.) Rost. *Aust. J. Exp. Agriculture*, **35**, 543-546.
- 📖 Omura, T., Ishimura, Y. & Fujii-Kuriyama, Y. (1993). Cytochrome P450, 2nd edition. VCH Publishers, New York.
- 📖 Ooijkaass, L.P.; Tramper, J. & Buitelaar, R.M. (1998). Biomass estimation of *Coniothyrium minitans* in solid-state fermentation. *Enzyme and Microb. Technol.*, **22**, 480-486.
- 📖 Pandey, A. (2003). Solid-State Fermentation. *Biochem. Engin. J.*, **13**, 81-84
- 📖 Pandey, A.; Soccol, C.R., Rodriguez-Leon, J.A. & Nigam, P. (2001). Solid-State Fermentation in Biotechnology - Fundamentals and Applications. Asiatech Publishers, Inc., New Delhi.

- 📖 Pankhurst, C.E., McDonald, H.J. & Hawke, B.G. (1995). Influence of soil-water matric potential on the control of *Phythium* root infection of wheat with metalaxyl in two contrasting soils of South Australia. *Aust. J. Exp. Agriculture*, **35**, 603-610.
- 📖 Paolini, M., Mesirca, R., Pozetti, L., Sapone, A., Cantelli-Forti, G. (1996). Biomarkers of effect in evaluating metalaxyl cocarcinogenesis. Selective induction of murine CYP 3A isoform. *Mutat. Res.*, **361**, 157-164.
- 📖 Papini, S. & Andréa, M.M. (2000). Enhanced Degradation of Metalaxyl in Gley and Humic Dark Red Latosol. *R. Bras. Ci. Solo*, **24**, 469-474.
- 📖 Papini, S. & Andréa, M.M. (2001). Enhanced degradation of metalaxyl in agricultural soil of São Paulo State, Brazil. *Pesq. Agropec. Bras.*, **36**, 1-5.
- 📖 Parlar, H. (1990). The role of photolysis in the fate of pesticides. In: *Environmental Fate of Pesticides*. Hutson, D.H. & Roberts, T.R. (Eds.), Progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, Vol. 7, pp. 245-275, John Wiley & Sons, Chichester, England.
- 📖 Pasanen, A.L., Yli-Pietilä, K., Pasanen, P., Kalliokoski & Tarhanen, J. (1999). Ergosterol Content in Various Fungal Species and Biocontaminated Building Materials. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 138-142.
- 📖 Paul, E. A. & Clark, F.E. (1989). *Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press Inc., San Diego.
- 📖 Peng, C.A & Bly, M.J. (1998) Analysis of xenobiotic bioremediation in a co-immobilized mixed culture system. *Bioch. Eng. Journal*, **1**, 63-75. **VER**
- 📖 Pereira, P. T. (1996). Eliminação biológica de cianeto por fungos filamentosos. Tese de doutoramento, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa.
- 📖 Peroco, P., Colacci, A., Bonora, B., Grilli, S. (1995). In vitro transforming effect of the fungicides metalaxyl and zineb. *Teratog., Carcinog. Mutag.*, **15**, 73-80.
- 📖 Picó, Y., Moltó, J.C., Redondo, M.J., Viana, E. & Font, J.M.G. (1994). Monitoring the Pesticide Levels in Natural Waters of the Valencia Community (Spain). *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, **532**, 230-237.
- 📖 Pitcher, D. Saunders, N. & Owen, R. (1989). Rapid Extraction of Bacterial DNA with Guanidine Thyocyanate. *Letters in Applied Microbiol.*, **8**, 151-156.

- 📖 Pritchard, P.H. & Bourquin, A.W. (1985). Microbial Toxicity studies. In: *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Rand, G.M. & Petrocelli, S.R. (Eds.), pp. 177-217. Hemisphere, Washington, D.C.
- 📖 Racke, K.D. (1990a). Pesticides in Soil Microbial Ecosystem. In: *Enhanced Biodegradation of Pesticides in the Environment*. Racke, K.D. & Coats, J.R. (Eds.), pp. 1-13. A.C.S. Symposium Series nº 426. American Chemical Society, Washington, DC.
- 📖 Racke, K.D. (1990b). Implications of Enhanced Biodegradation for the Use and Study of Pesticides in the Soil Environment. In: *Enhanced Biodegradation of Pesticides in the Environment*. Racke, K.D. & Coats, J.R. (Eds.), pp. 269-282. A.C.S. Symposium Series nº 426. American Chemical Society, Washington, DC.
- 📖 Raimbault, M. (1998). General and Microbial Aspects of Solid Substrate Fermentation. *Electron J. Biotechnol.*, **1**, 1-15. (Review Article)
- 📖 Rand, G.M. e Petrocelli, S.R. (1985). Introduction to the Aquatic Toxicology. In: *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Rand, G.M. e Petrocelli, S.R. (Eds.), pp 1-28. Hemisphere, Washington, DC.
- 📖 Rath, A.K., Ramakrishan, B., Rath, A.K., Kumaraswamy, S., Bharati, K. Singla, P. & Sethunathan, N. (1998). Effects of Pesticides on Microbial Biomass of Flooded Soil, *Chemosphere*, **37**, 661-671.
- 📖 Reigart, J. R. & Roberts, J. R. (1999). Recognition and Management of Pesticide Poisonings, 5th Edition. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- 📖 Reis, E.; Melo, P.; Andrade R. & Calapez, T. (2001). Estatística Aplicada. Vol.2, Edições Sílabo, Lisboa.
- 📖 Rhiem, H. (1958). Die Ammoniumlaktatesse, aure – Méthode zur bestimmung der leichtlöslichen phosphorsäure in karbonathaltigboden. *Agrochimica*, **3**, 49–65.
- 📖 Rhoades, J.D.; Manteghi, N.A., Shouse, P.J. & Alves, W.J. (1989). Soil electrical conductivity and soil salinity. New formulations and calibrations. *Soil Soc. Am. J.*, **53**, 433-439.
- 📖 Ribeiro, J.R. & Gonçalves, M. (2000). Protecção Integrada da vinha – Lista de Produtos Fitofarmacêuticos e Níveis Económicos de Ataque. Ministério da Agricultura, Direcção Geral de Protecção das Culturas, Lisboa.

- ☞ Rice, P.J., Anderson, T.A & Coats, J.R. (1997). Evaluation of the use of vegetation for reducing the environmental impact in Phytoremediation of soil water contaminants. In: *Enhanced Biodegradation of Pesticides in the Environment*. Kinger, E.L., Anderson, T.A. & Coats, J.R. (Eds.). ACS Symposium Series 664, pp. 162-176. American Chemical Society, Washington, DC.
- ☞ Roberts, T.R. (1990) Environmental fate of pesticides: a perspective In: *Environmental Fate of Pesticides*. Hutson, D.H. & Roberts, T.R. (Eds.), Progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology Vol. 7, pp. 1-12, John Wiley & Sons, Chichester, England.
- ☞ Roeth, F.W.; Wilson, R.G.; Martin, A.R & Shea, P.J. (1990). Enhanced Carbamothioate Herbicide Degradation. In: *Enhanced Biodegradation of Pesticides in the Environment*. Racke, K.D. & Coats, J.R. (Eds.). A.C.S. Symposium Series nº 426, pp. 23-36. American Chemical Society, Washington, DC.
- ☞ Roper, M.M. & Ophel-Keller, K.M. (1998). Soil Microflora as Bioindicators of Soil Health. In: *Biological Indicators of Soil Health*. Pankhurst, C.E., Doube, B.M. & Gupta, V.V.S.R. (Eds.), pp. 157-177. CABI Publishing, New York.
- ☞ Rowell, D.L. (1994). Soil Science. Methods and Applications. Longman Scientific Technical, Harlow, England.
- ☞ Russell, M.H. (1995). Recommended approaches to asses pesticide mobility in soil. In: *Environmental Behaviour of Agrochemicals*. Roberts, T.R. & Kearney, P.C. (Eds.), Progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, Vol. 9, pp. 57-129. John Wiley & Sons, Chichester, England.
- ☞ Sambrook, J., Feitsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- ☞ Sankpal, N.V., Joshi, A.P., Sainkar, S.R. & Kulkarni, B.D. (2001). Production of dextran by *Rhizopus* sp. immobilized on porous cellulose support. *Process Biochemistry*, **37**, 395-403.
- ☞ Schiavon, M.& Morel, J.L. (1995). Propriétés Physique-chimiques des Sols et Dégradation des Pesticides, *O.C.L. – Oleagineus, Corps Gras and Lipids*, **2**, 451-452.
- ☞ Schofield, R.K. & Taylor, A.W. (1955). The measurement of soil pH. *Proc. Soil Sci. Am.*, **19**, 164-167.

- 📖 Schrap, S.M., Heuvel, H, Meulen, J., Ruiten, H. & Parsons, J. R. (2000) A Chemostat system for investigating pesticide biodegradation in continuous mixed bacteria cultures originating from surface water. *Chemosphere*, **40**, 1389-1397.
- 📖 Seiber, J.N., Gletfelty, D.E., Lucas, A.D., Mcchesney, M.M., John C.Sagebiel e Wehner, T.A. (1990). A multiresidue method by high performance liquid chromatography-based fraction and gas chromatographic determination of trace levels of pesticides in air and water. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **18**, 583-592.
- 📖 Seitz, L.M., Sauer, D.B., Burroughs, R., Mohr, H.E. & Hubbard, J.D. (1979). Ergosterol as a measure of fungal growth. *Phytopatology*, **69**, 1202-1203.
- 📖 Sethunathan, N., Adhya, T.K & Raghu, K. (1982). Microbial degradation of pesticides in Tropical Soils. In: *Biodegradation of Pesticides*. Matsumura, F. & Murti, C.R.K. (Eds.), pp. 91-111. Plenum Press, New York.
- 📖 Sharma, D. & Awasthi, M.D. (1997). Adsorption and movement of metalaxyl in soils under unsaturated flow conditions. *Plant and Soil*, **195**, 293-298.
- 📖 Sharom, M.S. & Edigton, L.V. (1982) Adsorption and mobility of metalaxyl in soils and aqueous system. *Can. J. Plant Pathol.*, **4**, 334-340.
- 📖 Siddique, T.; Okeke, B.C.; M Arshad, M. & Frankenberger, W.T. (2003). Enrichment and Isolation of Endosulfan-Degrading Microorganisms. *J. Environ. Quality*, **32**, 47-54.
- 📖 Sinclair, C.G. & Cantero, D. (1990). Fermentation modeling. In: *Fermentation. A Practical Approach*, McNeil, B. & Harvey, L.M. (Eds.), pp.65-112. IRL Press at Oxford University Press, Oxford.
- 📖 Singh, U., S. & Tripathi, R.K. (1982). Physicochemical and biological properties of Metalaxyl. *Indian J. Mycol. Plant Pathol*, **12**, 287-294.
- 📖 Sipes, J.G., Gandofi, A.J. (1991). Biotransformation of toxicants. In: *Toxicology*, 4th edition, Pergamon, Press, Oxford.
- 📖 Sisler, H.D. (1982). Biodegradation of Agricultural Fungicides In: *Biodegradation of Pesticides*, Eds. Matsumura, F. & Murti, C.R.K., pp. 133-151. Plenum Press, New York.
- 📖 Skipper, H.D., Wollum II, A.G., Turco, R.F. & Wolf, D.C. (1996). Microbial Aspects of Environmental Fate Studies of Pesticides. *Weed Technology*, **10**, 174-190.

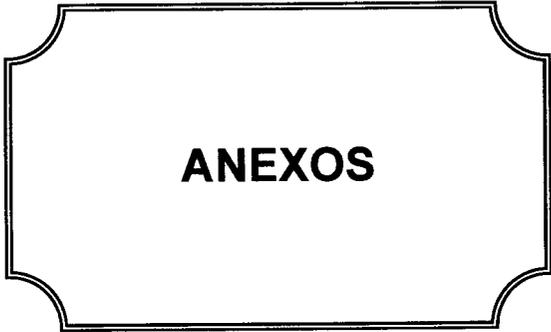
-
- 📖 Slipes, J.G., Gandofi, A.J. (1991). Biotransformation of toxicants. In: Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. Ambur, M.O., Doull, J. e Klaasen, C.D. (Eds.), 4th edition. Pergamon Press, Oxford.
- 📖 Smith, A.E. & Lafond, G.P. (1990). Effects of Long-Term Phenoxyalkanoic Acid Herbicide Field Applications on the Rate of Microbial Degradation. In: *Enhanced Biodegradation of Pesticides in the Environment*. Racke, K.D. & Coats, J.R. (Eds.) A.C.S. Symposium Series n° 426, pp. 14-22. American Chemical Society, Washington, DC.
- 📖 Smith, G. (1969). An Introduction to Industrial Mycology, 6th. Edition. Edward Arnold (publishers), Lda., London.
- 📖 Smith, J.E. (1990). Solid-state fermentations and food production. In: *Processing and Quality of Foods*. Zeuthen, P., Cheftel, J.E.; Eriksson, C.; Gormley, T.R. & Linko, K. (Eds.). Elsevier Science Publishing, London.
- 📖 Smith, P. (1995). Pesticides in Foodstuffs. In: *Pesticides – Developments, Impacts, and Controls*, Best, G. & Ruthven, D. (Eds.), pp. 62-73. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- 📖 Sobreiro, J.B & Reis, J.C (2000). Guia dos Produtos Fitofarmacêuticos. Lista dos produtos com venda autorizada. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, Direcção Geral de Protecção das Culturas, Oeiras.
- 📖 Soil Survey Staff (1975). Soil Taxonomy: a basic system of soil classification for making and interpreting soil surveys: USDA Agriculture Handbook 436, pp. 754. Washington, D.C., U.S. Government Printing Office.
- 📖 Somerville, L. (1987). Perspectives on Side-Effects Testing. In: *Pesticide Effects on Soil Microflora*. Somerville L. & Greaves M.P. (Eds.), pp. 5-14. Taylor & Francis, London.
- 📖 Spaargaren, O.C. (Ed.), 1994. World Reference Base for Soil Resources. International Society of Soil Science, International Soil Reference and Information Center (ISRIC) and Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Wageningen, Rome.
- 📖 Stanbury, P.F. & Whitaker, A. (1984). Principles of Fermentation Technology. Pergamon Press, Oxford.
-

- 📖 Sukul, P., Moza, P.N., Hustert, K & Kettrup, A. (1992). Photochemistry of Metalaxyl. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 2488-2492.
- 📖 Sukul. P. & Spitller M. (2000). Sorption Study on Metalaxyl in Soils of different Physicochemical Properties. *Fresenius Environ. Bull.*, **9**, 701-710.
- 📖 Sukul. P. & Spitller M. (2001a). Persistence, Fate and Metabolism of [14 C] Metalaxyl in Typical Indian Soils. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 2352-2358.
- 📖 Sukul. P. & Spitller M. (2001b). Influence of biotic and abiotic factors on dissipating metalaxyl in soil. *Chemosphere*, **45**, 941-947.
- 📖 Taiwo, L.B. & Oso, B.A. (1997). The Influence of some pesticides on soil microbial flora in relation to changes in nutrient level, rock phosphate solubilization and P release under laboratory conditions. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **65**, 59-68.
- 📖 Tan, K. W. (1994). *Environmental Soil Science*, pp. 51-68. Marcel Dekker, Inc, New York.
- 📖 Tautz, D. & Renz, M (1984). Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukariotic genomes. *Nuc. Acids Res.*, **12**, 4127-4138.
- 📖 Taylor, A.W. e Spencer, W.F. (1990). Volatilization and vapor transport process in Pesticides. In: *Soil Environment: Processes, Impacts, and Modeling*. Cheng, H.H. (Ed.), pp. 217-265. Soil Science Society of America, Madison WI.
- 📖 Thomas, G.W. (1982). Exchangeable Cations. In: *Methods of Soil Analysis, Part 2. Chemical and Microbial Properties*. Page, A. L., Miller, R.H. & Keeney, D.R. (Eds.), 2nd edition, pp. 159-165. American Society of Agronomy, Madison, USA.
- 📖 Timbrell, J.A.(1991). *Principles of Biochemical Toxicology*, 2nd edition. Taylor & Francis, London.
- 📖 Timis, K.N. & Pieper, D.H. (1999). Bacteria designed for Bioremediation. *Trends in Biotechnology*, **17**, 201-204.
- 📖 Tomlin, C. (1995). *The Pesticide Manual*, 10th edition. British Crop Protection Council, Cambridge

- 📖 Torstensson, N.T.L. (1987). Microbial decomposition of herbicides in soil. In: *Herbicides*. Hudson, D. H. & Roberts, T. R. (Eds.), Progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, Vol. 6, pp. 249-270. John Wiley & Sons, New York.
- 📖 Turko, R.F. & Sadowsky, M. (1995). The Microflora of Bioremediation. In: *Bioremediation, Science and Applications*. SSSA, Special Publication, **43**, 87-102. American Chemical Society, Washington, DC.
- 📖 Tykva, R. (1996). Analysis of groundwater remediation during a pesticide application. In: *Advances in Groundwater Pollution Control and Remediation*. Aral, M.M. (Ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- 📖 Van Bruggen, A.H.C., Milgroom, M.G., Osmeloski, J.F., Fry, W.E & Jacobson, J.S. (1987). Attenuation of metalaxyl on potato leaves by simulated acidic rain and resistance time. *Phytopatology*, **77**, 401-406.
- 📖 Viviani-Nauer, A, Hoffmann-Boller, P. & Gafner, J. (1997a). In vitro Detection of Folpet and its degradation to Phthalimide in Aqueous Solutions and in Yeast Suspensions. *Am. J. Enol. Vitic.*, **48**, 63-66.
- 📖 Viviani-Nauer, A, Hoffmann-Boller, P. & Gafner, J. (1997b). In vivo Detection of Folpet and its Metabolite Phthalimide in Grape Must and Wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **48**, 67-70.
- 📖 Walker, A. & Welch, S.J. (1990). Enhanced Biodegradation of Dicarboximide Fungicides in Soil. In: *Enhanced Biodegradation of Pesticides in the Environment*. Racke, K.D. & Coats, J.R. (Eds.), pp. 53-67. A.C.S. Symposium Series n° 426. American Chemical Society, Washington, DC.
- 📖 Wang, H.G., Peng, G.Y., Wen & Qi M.W. (1995). Study on degradation and residues on ¹⁴C-metalaxyl in soil. *Acta Agric. Univ. Pekin*, **21**, 395-401.
- 📖 Warren, R.L & Weber, J.B. (1994) Evaluating Pesticide Movement in North Carolina Soils, *Proceedings of Soil Science Society of North Carolina* , **37**, 23 -35.
- 📖 Warton, B & Matthiessen, J (2000). Factors Affecting Induction of Enhanced Biodegradation of Metham Sodium. *How Degrading, CSIRO Entomology*, **2**, 1.
- 📖 Wauchope, R. D., Buttler, T. M., Hornsby A. G., Augustijn Beckers, P. W. M. and Burt, J. P. (1992). The SCS/ARS/CES pesticide properties database for environmental decision-making. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **123**, 1-157.

- Wayman M. & Parekh, S.R. (1990). *Biotechnology of Biomass Conversion*. Open University Press, Milton Keynes.
- Weber, J.B. (1993). Bioavailability and Bioactivity of Sorbed Organic Chemicals. In: *Sorption and Degradation of Pesticides and Organic Chemicals in Soil*. Linn, D.M., Clarck, T.H., Brusseau, M.L. & Chang, F.H. (Eds.). SSSA Special Publication, nº 32, pp. 153-196. Soil Science Society of America, Inc. Madison.
- Weber, J.B. (1994). Properties and Behaviour of Pesticides in Soil. In: *Mechanisms of Pesticide Movement into GroundWater*. Honeycutt, R. C. & Schabacker, D.J. (Eds.), pp. 15-41. Lewis Publishers, Florida.
- Weber, J.B. (1995). Physicochemical and Mobility Studies with Pesticides. In: *Agrochemical Environmental Fate*. Leng, M.L. Leoveey, E.M.K. & Zubkoff, P.L. (Eds.), pp. 99-115. Lewis Publishers, New York.
- Weising, K., Nybon, H., Wolff, K & Meyer, W. (1995). *DNA Fingerprinting in Plants and Fungi*. CRC Press, London.
- Welsh, J. & McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 7213-7218.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R, Livak, K.J., Rafalski, J.A. & Tingey, S.V. (1990). DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are useful as Genetic Markers. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 6531-6535.
- Williams, W. M., Holden, P. W., Parsons, D. W. & Lorber, M. N. (1988). Pesticides in Groundwater Database: Interim Report, pp. 10-49. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs, Washington, DC.
- Wolfe, N.L., Mingelgrin, U. & Miller, G.C. (1990). Abiotic transformations in water, sediments and soil. In: *Pesticides in Soil Environment: Processes, Impacts, and Modeling*. Cheng, H.H. (Ed.), pp. 103-161. Soil Science Society of America, Madison.
- Wolfe, N.L., Zepp, R.G., Doster, J.C. & Hollis, R.C. (1976). Captan hydrolysis. *J. Agric. Food Chem.*, **24**, 1041-1045.
- Wollum II, A.G. (1982). Cultural Methods for Soil Microorganisms. In: *Methods of Soil Analysis, Part 2. Chemical and Microbial Properties*. Page, A. L., Miller, R.H. & Keeney, D.R. (Eds.), 2nd edition, pp. 781-801. American Society of Agronomy, Madison, USA.

- 📖 Wood, M. (1995). *Environmental Soil Biology*, 2nd edition, pp. 13-40. Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall, London.
- 📖 Woodrow, J.E., McChesney, M.M. & Seiber, J.N. (1990). Modeling the volatilization of pesticides and their distribution in the atmosphere. In: *Long Range Transport of Pesticides*. Kurtz, D.A. (Ed.), pp. 61-81. Lewis Publishers, Michigan.
- 📖 Yao, J. R., Liu, S.Y., Freyer, A.J., Minard, R.D. & Bollag, J.M. (1989). Photodecomposition of Metalaxyl in an Aqueous Solution. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 1518-1523.
- 📖 Zadra, C.; Marucchini, C. & Zazzerini, A. (2002). Behavior of Metalaxyl and its Pure R-Enantiomer in Sunflower Plants (*Helianthus annuus*). *J. of Agric. Food Chem.*, **50**, 5373-5377.
- 📖 Zalidis, G., Stamatiadis, S., Takavakoglou, V., Eskridge, K. & Misopolinis, N. (2002). Impacts of agricultural practices on soil and water quality in the Mediterranean region and proposed assessment methodology. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **88**, 137-146.
- 📖 Zhang, R., Krzyszowska, A.J., Vance, G.F. & Qi, J. (2000). Pesticide Transport in Field Soils. *Advanc. Environm. Res.*, **4**, 59-68.
- 📖 Zheng, Z., Liu, S.Y., Freyer, A.J. & Bollag, J.M. (1989). Transformation of Metalaxyl by the Fungus *Syncephalastrum racemosum*. *App. Environ. Microbiol.*, **55**, 66-71.



ANEXOS

Anexo I

A- Lista dos reagentes comerciais utilizados

Nome	Fórmula Química	Marca
Acetato de amónio	CH ₃ COONH ₄	Merck
Acetato de sódio anidro	CH ₃ COONa	Sigma
Acetona for liquid chromatography, Lichrosolv®	(CH ₃) ₂ CO	Merck
Acetonitrilo Gradient Grade for Chromatography, Lichrosolv® 99,9 %, (d = 0,78)	CH ₃ CN	Merck
Ácido acético glacial 100% GR for Analysis (d = 1,06)	CH ₃ COOH	Merck
Ácido ascórbico, L(+)	C ₆ H ₈ O ₆	Merck
Ácido bórico (d=1,44)	H ₃ BO ₃	Merck
Ácido clorídrico, pró análise (37%)	HCl	Merck
Ácido sulfúrico 96 % (d= 1,84)	H ₂ SO ₄	Merck
Agarose LE GQ	----	Fermentas
Álcool isoamílico	C ₅ H ₁₂ O	Sigma
Azul de bromofenol	C ₁₉ H ₉ Br ₄ NaO ₅ S	Merck
Brometo de etídio	C ₂₁ H ₂₀ BrN ₃	Sigma
Carbonato de sódio	Na ₂ CO ₃ .H ₂ O	Merck
Cicloheximida	C ₁₅ H ₂₃ NO ₄	Riedel-de Haën
Cloranfenicol	C ₁₁ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O ₅	Riedel-de Haën
Cloreto de potássio	KCl	Merck
Cloreto de sódio	NaCl	Sigma
Clorofórmio	CHCl ₃	Sigma
Dicromato de potássio	K ₂ Cr ₂ O ₇	Merck

Difenilamina	$C_{12}H_{11}N$	Merck
EDTA	$C_{10}H_{14}K_2N_2O_8 \cdot 2H_2O$	Sigma
Etanol absoluto (d=0,79)	CH_3CH_2OH	Merck
Folpete (99,5%)	$C_9H_4Cl_3NO_2S$	Riedel-de Haën
Ftalimida	$C_8H_5NO_2$	Riedel-de Haën
Glicerol	$C_3H_8O_3$	Sigma
Hexametofosfato de sódio	$(NaPO_3)_{12} \cdot Na_2O$	Riedel
Hidróxido de sódio	$NaOH$	Merck
Metalaxyl (99,7%)	$C_{15}H_{21}NO_4$	Riedel-de Haën
Molibdato de amónio	$H_{24}Mo_7N_6O_{24} \cdot 4H_2O$	Merck
Nitrato de potássio	KNO_3	Merck
Peróxido de hidrogénio 30 % (Perhydrol®)	H_2O_2	Merck
SDS	$C_{12}H_{25}NaO_4S$	Sigma
sulfato ferroso amoniacal	$H_8FeN_2O_8S_2 \cdot 6H_2O$	Merck
TRIS (TRISMA BASE)	$C_4H_{11}NO_3$	Sigma
Xileno cianol	$C_{25}H_{27}N_2NaO_6S_2$	Sigma

B - Microrganismos padrão

Estirpe	Designação	Isolamento
<i>Gongronella butleri</i> (Lendner) Peyronel et Dal Vesco	ATCC 8989	amostras de solo (Wiscon) em PDA
<i>Gongronella lacrispora</i> Hesseltine et Ellis	ATCC 24412	amostras de solo (Maryland) em PDA

C- Composição de algumas soluções utilizadas nos métodos de análise molecular (Cap. 3):

***Tampão de lise (pH 8):**

Tris – HCl - 50 mM

NaCl - 250 mM

EDTA - 50 mM

SDS - 0,3 %

***Tampão de extracção – TE pH 8**

Tris 10 mM

EDTA 1 mM

***TBE 10 X (pH 8)**

TRIS – 890 mM

Ácido bórico – 890 mM

EDTA – 0,5 M

***TBE 1X**

Diluição de 1:10 da solução 10 X com água ultrapura estéril

***Solução de corante stock (6X)**

Azul de bromofenol 0,0025 g

Xilenocianol 0,0025 g

Glicerol 300 µL

TBE 1X 700 µL

***Solução de corante (1X) (para electroforese)**

Diluição de 1:6 da solução stock com TBE 1 X

Anexo II**A - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS MEIOS DE CULTURA
UTILIZADOS NESTE TRABALHO****Meio Malt Extract Agar (MEA)**

Malt extract (Oxoid)	20 g
Peptona bacteriológica (Oxoid)	1 g
D (+) Glucose (Merck)	20 g
Agar (Merck)	20 g
Água bidestilada	1 L

Meio Potato Dextrose Agar (PDA) (Merck)

Potato Dextrose Agar (Merck)	39 g
Água bidestilada	1 L

Meio Rose-Bengal com Cloranfenicol (CRB)

Rose Bengal Agar com cloranfenicol (Merck)	65,3 g
Água destilada	1 L

Meio Tryptone Soya Agar (TSA)

Tryptone Soy Agar (Merck)	40 g
Água bidestilada	1 L

Meio mínimo Yeast Nitrogen Base (YNB)

Bacto Yeast Nitrogen Base (Hi Média)	6,7 g
Água bidestilada	1 L

Meio mínimo Yeast Nitrogen Base com glucose (YNBG)

Bacto Yeast Nitrogen Base (Hi Média)	6,7 g
D (+) Glucose (Merck)	10 g
Água bidestilada	1 L

B –IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ATRAVÉS DO SISTEMA BIOLOG

Sistema Utilizado: Sistema miniaturizado BIOLOG Microlog™ System, Release 4.0 da Biolog Incorporation.

Procedimento:

Efectuar os teste de Gram e da Oxidase às estirpes em estudo

Isolar a cultura pura em placas de Petri contendo meio Biolog

Preparar suspensões com o fluido de inoculação com densidade óptica apropriada ao exame de Gram (20 % T para cocos Gram positivos e 63 % para bacilos Gram negativos e oxidase negativa)

Inocular 150µL da suspensão celular na microplaca apropriada (GP2 MicroPlate™ para cocos e GN2 MicroPlate™ para o bacilos.

Incubar 4 a 6 horas a 30°C. Efectuar a leitura da placa após este período de incubação e decorridas 16-24 horas utilizando o software Biolog Microlog 3 4.1 C

Comparar os resultados com a base de dados MicroLog Biolog 40 GP 401.KIC para determinar o grau de similaridade e a identificação do microrganismo

Nota: As microplacas GP2 e GN2 MicroPlate™ têm 96 poços e a distribuição dos substratos é a que se indica nas tabelas seguintes.

GP2 MicroPlate™

A1	água	A2	α-ciclo-dextrina	A3	β-ciclodextrina	A4	dextrina	A5	glicogénio	A6	insulina	A7	mannan	A8	tween 40	A9	tween 80	A10	N-acetil-D-glucosamina	A11	N-acetil-β-D-manoseamina	A12	amygdalin
B1	L-arabinose	B2	D-arabitol	B3	arbutin	B4	D-celobiose	B5	D-frutose	B6	L-fucose	B7	D-galactose	B8	Ácido D-galacturónico	B9	gentiobiose	B10	Ácido D-gluconico	B11	A-D-glucose	B12	m-inositol
C1	α-D-lactose	C2	lactulose	C3	maltose	C4	maltotriose	C5	D-manitol	C6	D-mannose	C7	D-melezitose	C8	D-melibiose	C9	α-metil-D-galactoside	C10	β-metil-D-galactoside	C11	3-metil-D-glucose	C12	α-metil-D-glucoside
D1	β-metil-D-glucoside	D2	α-metil-D-manoside	D3	palatinose	D4	D-psicose	D5	D-rafinose	D6	D-ramnose	D7	D-ribose	D8	salicin	D9	sedoheptulosan	D10	D-sorbitol	D11	stachyose	D12	sacarose
E1	D-tagatose	E2	D-trehalose	E3	turanose	E4	xilitol	E5	D-xilose	E6	Ácido acético	E7	Ácido α-hidroxi-butirico	E8	Ácido β-hidroxi-butirico	E9	Ácido γ-hidroxi-butirico	E10	Ácido p-hidroxi-fenilacético	E11	Ácido α-cetoglutarico	E12	Ácido α-cetovalérico
F1	lactamida	F2	Metil ester de D-ácido lactico	F3	L-ácido láctico	F4	D-ácido málico	F5	L-ácido málico	F6	Metil ester de ácido pirúvico	F7	Mono-metil ester de ácido succínico	F8	Ácido propiónico	F9	Ácido pirúvico	F10	Ácido succinamico	F11	Ácido succínico	F12	Ácido N-acetil-L-glutâmico
G1	L-alaninamida	G2	D-alanina	G3	L-alanina	G4	L-alanilglicina	G5	L-asparagina	G6	Ácido L-glutâmico	G7	Ácido glicil-L-glutâmico	G8	Ácido L-pirrolidínico	G9	L-serina	G10	putrescina	G11	2,3-butanodiol	G12	glicerol
H1	adenosina	H2	2'-deoxiadenosina	H3	inosina	H4	timidina	H5	uridina	H6	Adenosina-5'-monofosfato	H7	Timidina-5'-monofosfato	H8	Uridina-5'-monofosfato	H9	D-frutose-6-fosfato	H10	A-D-glucose-1-fosfato	H11	D-glucose-6-fosfato	H12	D-L-α-glicerol fosfato

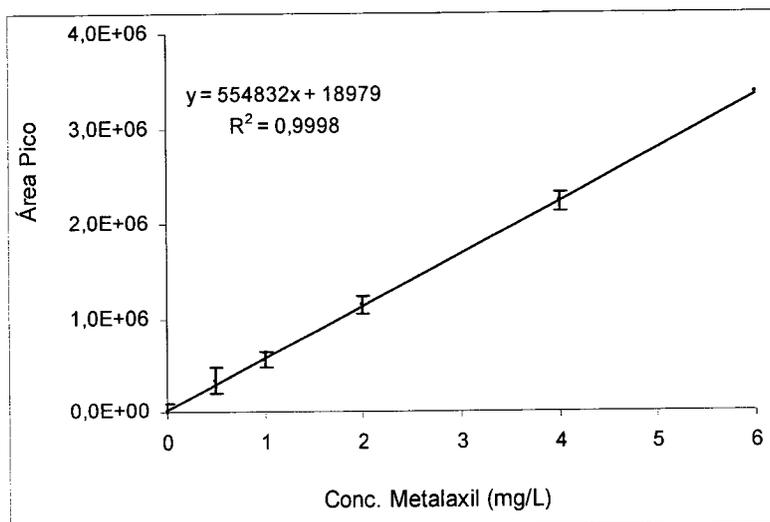
GN2 MicroPlate™

A1	água	A2	α-ciclo-dextrina	A3	dextrina	A4	glicogénio	A5	Tween 40	A6	Tween 80	A7	N-acetil-D-galactosamina	A8	N-acetil-D-glucosamina	A9	adonitol	A10	L-arabinose	A11	D-arabinol	A12	D-celobiose	
B1	i-eritritol	B2	D-frutose	B3	L-fucose	B4	D-galactose	B5	Gentiobiose	B6	α-D-glucose	B7	m-inositol	B8	α-D-lactose	B9	lactulose	B10	maltose	B11	D-manitol	B12	D-manose	
C1	meltiobiose	C2	β-metil-D-glucoside	C3	D-psicose	C4	D-rafinose	C5	L-ramnose	C6	D-sorbitol	C7	sacarose	C8	Ditribose	C9	turanose	C10	xilitol	C11	Piruvato de metilo	C12	Monometil-uccinato	
D1	Ácido acético	D2	Ácido cis-aconítico	D3	Ácido cítrico	D4	Ácido fórmico	D5	Ácido D-galactónico	D6	Ácido D-galacturónico	D7	Ácido D-glucorónico	D8	Ácido D-glucosamínico	D9	Ácido D-glucorónico	D10	Ácido α-hidroxitbutírico	D11	Ácido β-hidroxitbutírico	D12	Ácido γ-hidroxitbutírico	
E1	Ácido p-hidroxifenilacético	E2	Ácido iatacónico	E3	Ácido α-cetobutírico	E4	Ácido α-cetoglutarico	E5	Ácido α-cetovalérico	E6	Ácido D,L-láctico	E7	Ácido malónico	E8	Ácido propiónico	E9	Ácido quínico	E10	Ácido D-sacarídico	E11	Ácido cebáico	E12	Ácido succínico	
F1	Ácido bromossuccínico	F2	Ácido succinamínico	F3	glucoranamida	F4	L-alaninamida	F5	D-alanina	F6	L-alanina	F7	L-alanil-glicina	F8	L-arpargina	F9	Ácido L-aspártico	F10	Ácido L-glutámico	F11	Ácido glicil-L-aspártico	F12	Ácido glicil-L-glutámico	
G1	L-alaninamida	G2	D-alanina	G3	L-alanina	G4	L-alanilglicina	G5	L-asparagina	G6	Ácido L-glutámico	G7	Ácido glicil-L-glutámico	G8	Ácido L-piroglutámico	G9	L-serina	G10	putrescina	G11	2,3-butanodiol	G12	glicerol	
H1	Ácido urocánico	H2	Inosina	H3	Uridina	H4	Timidina	H5	Feniletilamina	H6	Putrescina	H7	2-aminoetanol	H8	2,3-butanediol	H9	glicerol	H10	D,L-α-glicerol fosfato	H11	α-D-glucose-1-fosfato	H12	D-glucose 6-P	

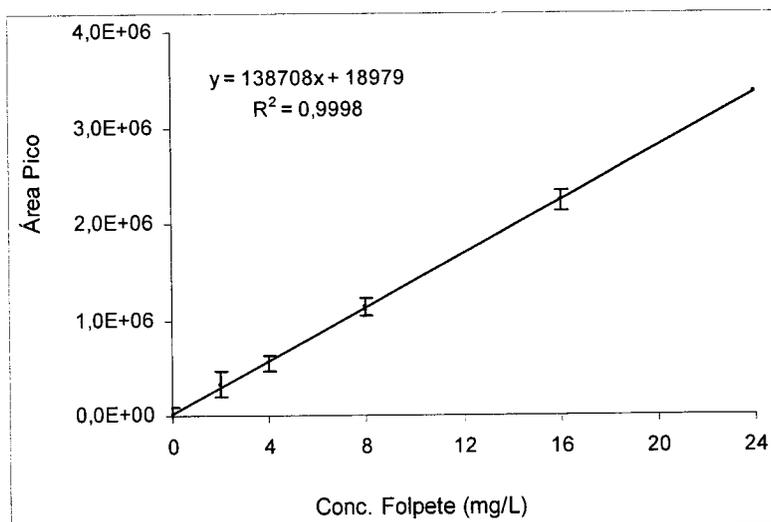
Anexo III

A - Degradação do fungicida comercial em solos

Curva de Calibração do Metalaxil

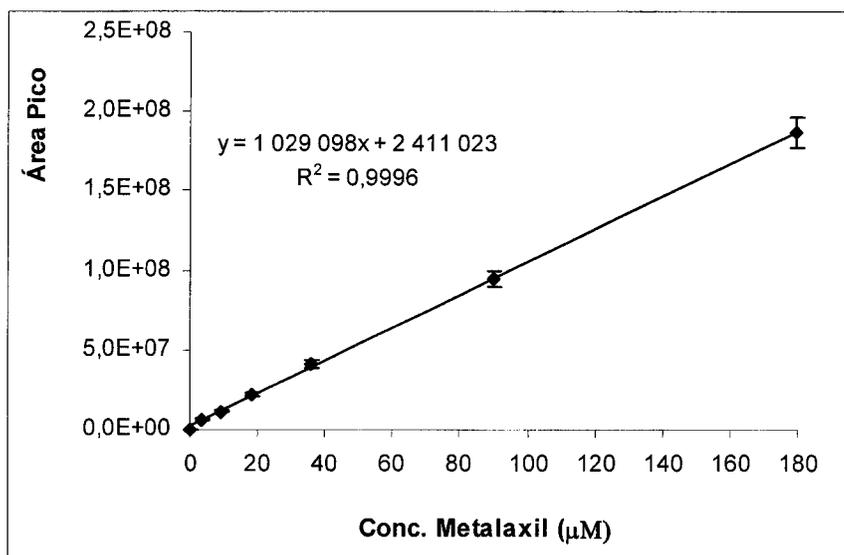


Curva de Calibração do Folpete

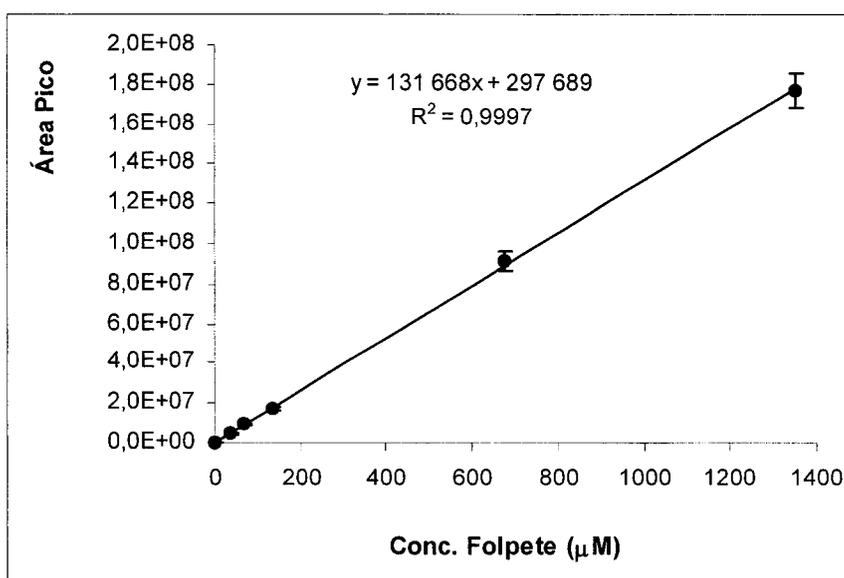


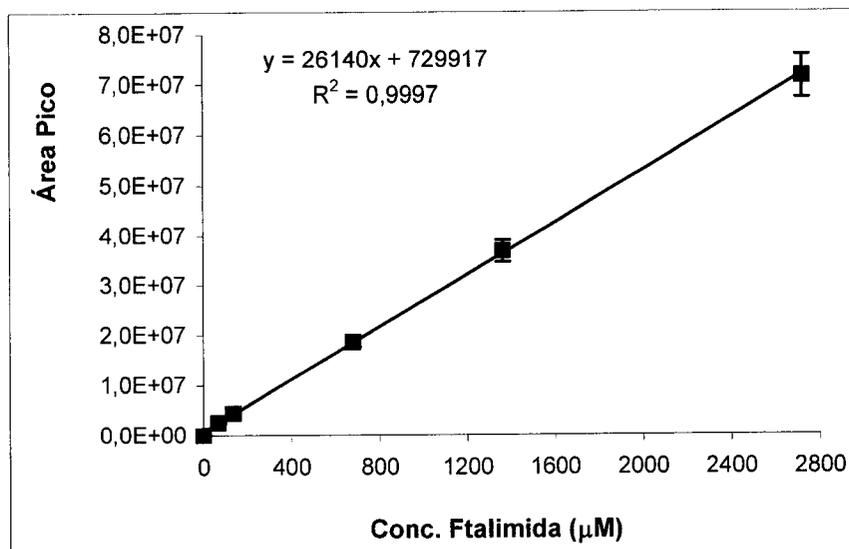
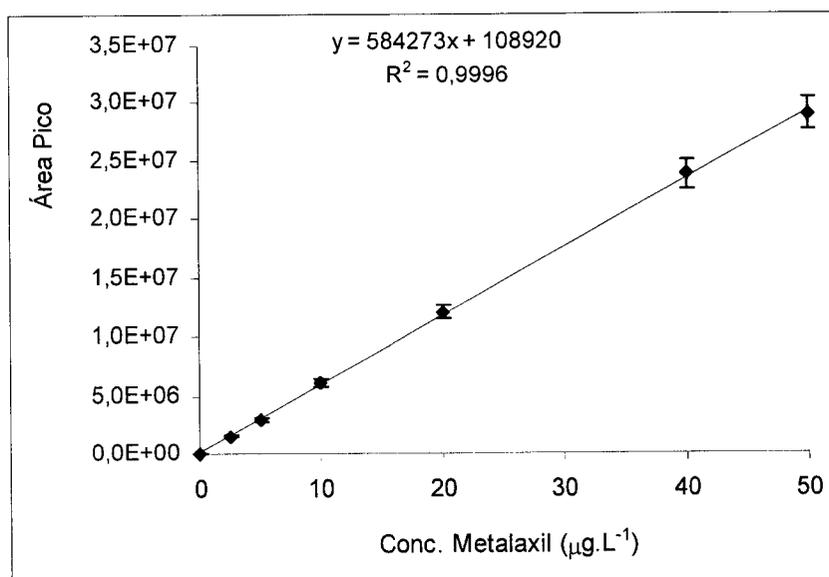
B –Degradação do Metalaxil e do Folpete em meio aquoso

Curva de Calibração do Metalaxil



Curva de Calibração do Folpete



Curva de Calibração para a Ftalimida**C – Degradação do metalaxil no solo por fungos seleccionados****Curva de Calibração do Metalaxil**

Anexo IV

A – Análise Estatística do estudo de degradação do metalaxil e do folpete por populações mistas de três amostras de solo

Tabela IV.1 - Análise da variância (ANOVA II de efeitos fixos com interação) da taxa de degradação do metalaxil quando aplicado em três concentrações de fungicida comercial: 0,5; 1 e 2 mg.g⁻¹ solo em três amostras de solo.

Variável dependente: Degradação de Metalaxil

Fontes de variação	Soma de quadrados (tipo III)	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Valor de F	Valor de p (Sig.)
Modelo corrigido	3,144 ^a	8	0,393	57730,439	0,000
Intercepção	8,994	1	8,994	1321149,307	0,000
TSOLO	1,289	2	0,644	94645,232	0,000
CONC	1,583	2	0,792	116298,864	0,000
TSOLO * CONC	0,272	4	0,068	9988,829	0,000
Erro (dentro dos grupos)	1,838E-04	27	0,000068		
Total	12,138	36			

(TSOLO – tipo de amostra de solo: A, B ou C)

(CONC- concentração de fungicida comercial aplicada)

Tabela IV.2- Valores médios e diferenças significativas para $p < 0,01$ das taxas de degradação obtidas para cada tipo de amostra de solo

	(I) Tipo de amostra	(J) Tipo de amostra	Média da diferença (I-J)	Sig. (99%)
Tukey HSD	Solo A	Solo B	0,213079*	0,000
		Solo C	0,462949*	0,000
	Solo B	Solo A	-0,213079*	0,000
		Solo C	0,249870*	0,000
	Solo C	Solo A	0,462949*	0,000
		Solo B	0,249870*	0,000

Tabela IV.3- Valores médios e diferenças significativas para $p < 0,01$ das taxas de degradação para as três concentrações de fungicida comercial estudadas: 0,5, 1 e 2 mg.g⁻¹ solo

(I) Conc. Fung	(J) Conc. Fung I	Média da difer (I-J)	Sig. (99%)
0,5 mg	1 mg	0,200536*	0,000
	2 mg	0,509868*	0,000
1 mg	0,5 mg	0,200536*	0,000
	2 mg	0,309332*	0,000
2 mg	0,5 mg	0,509868*	0,000
	1 mg	0,309332*	0,000

Tabela IV.4- Análise da variância (ANOVA II de efeitos fixos com interação) nos controles (solo autoclavado) da taxa de degradação do metalaxil quando aplicado em três concentrações de fungicida comercial: 0,5 ; 1 e 2 mg.g⁻¹ solo nas três amostras de solo.

Variável dependente: Degradação de Metalaxil - Controle

Fontes de variação	Soma de quadrados (tipo III)	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Valor de F	Valor de p (Sig.)
Modelo corrigido	0,101	8	1,265E-02	6902,363	0,000
Intercepção	0,325	1	0,325	177050,273	0,000
TSOLO	9,100E-07	2	4,550E-07	0,248	0,782
CONC	0,101	2	5,061E-02	27607,602	0,000
TSOLO * CONC	5,865E-06	4	1,466E-06	0,800	0,536
Erro (dentro dos grupos)	4,950E-05	27	1,833E-06		
Total	0,426	36			

(TSOLO – tipo de amostra de solo: A, B ou C)

(CONC- concentração de fungicida comercial aplicada)

Tabela IV.5 - Valores médios e diferenças significativas para $p < 0,01$ observadas no controle para as três concentrações de fungicida comercial estudadas

	(I) Conc. Fung comercial	(J) Conc. Fung comercial	Média da diferença (I-J)	Sig. (99%)
Tukey HSD	0,5 mg	1 mg	5,889320E-02*	0,000
		2 mg	-0,129706*	0,000
	1 mg	0,5 mg	5,88932E-02*	0,000
		2 mg	7,081255E-02*	0,000
	2 mg	0,5 mg	0,129706*	0,000
		1 mg	7,08126E-02*	0,000

Tabela IV.6 - Análise da variância (ANOVA II de efeitos fixos com interação) da taxa de degradação do folpete quando aplicado em três concentrações de fungicida comercial: 0,5; 1 e 2 mg.g⁻¹ solo em três amostras de solo.

Variável dependente: Degradação de Folpete

Fontes de variação	Soma de quadrados (tipo III)	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Valor de F	Valor de p (Sig.)
Modelo corrigido	63,81	8	7,976	858124,2	0,000
Intercepção	383,47	1	383,47	4,10E+07	0,000
TSOLO	21,01	2	10,51	1130255	0,000
CONC	41,18	2	20,59	2215242	0,000
TSOLO * CONC	1,617	4	0,404	43488,7	0,000
Erro (dentro dos grupos)	2,510E-04	27	9,295E-06		
Total	447,28	36			

(TSOLO – tipo de amostra de solo: A, B ou C)

(CONC- concentração de fungicida comercial aplicada)

Tabela IV. 7. - Valores médios e diferenças significativas para $p < 0,01$ das taxas de degradação obtidas para cada tipo de amostra de solo

	(I) Tipo de amostra de solo	(J) Tipo de amostra	Média da diferença (I-J)	Sig. (99%)
Tukey HSD	Solo A	Solo B	0,77502	0,000
		Solo C	1,8626	0,000
	Solo B	Solo A	-0,77502	0,000
		Solo C	1,08759	0,000
	Solo C	Solo A	-1,8626	0,000
		Solo B	-1,98576	0,000

Tabela IV.8- Valores médios e diferenças significativas para $p < 0,01$ das taxas de degradação para as três concentrações de fungicida comercial estudadas: 0,5, 1 e 2 mg.g⁻¹ solo

(I) Conc. Fung comercial	(J) Conc. Fung comercial	Média da diferença (I-J)	Sig. (99%)
0,5 mg	1 mg	-1,3294*	0,000
	2 mg	-2,6197*	0,000
1 mg	0,5 mg	1,32939*	0,000
	2 mg	-1,29034*	0,000
2 mg	0,5 mg	2,61973*	0,000
	1 mg	1,29034*	0,000

Tabela IV.9. - Análise da variância (ANOVA II de efeitos fixos com interação) nos controles (solo autoclavado) da taxa de degradação do folpete quando aplicado em três concentrações de fungicida comercial: 0,5 ; 1 e 2 mg.g⁻¹ solo nas três amostras de solo.

Variável dependente: Degradação de Folpete - Controle

Fontes de variação	Soma de quadrados (tipo III)	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Valor de F	Valor de p (Sig.)
Modelo corrigido	9,218	8	1,152	42780,46	0,000
Intercepção	32,473	1	32,473	1205684	0,000
TSOLO	2,12E-04	2	1,059E-04	3,933	0,320
CONC	9,217	2	4,609	171114,3	0,000
TSOLO * CONC	1,942E-04	4	4,854E-05	1,802	0,158
Erro (dentro dos grupos)	7,272E-04	27	2,693E-06		
Total	41,692	36			

(TSOLO – tipo de amostra de solo: A, B ou C)

(CONC- concentração de fungicida comercial aplicada)

Tabela IV.10 - Valores médios e diferenças significativas para $p < 0,01$ observadas no controle para as três concentrações de fungicida comercial estudadas

	(I) Conc. Fung comercial	(J) Conc. Fung comercial	Média da diferença (I-J)	Sig. (99%)
Tukey HSD	0,5 mg	1 mg	-0,38312*	0,000
		2 mg	-1,21239*	0,000
	1 mg	0,5 mg	0,38312*	0,000
		2 mg	-0,82927*	0,000
	2 mg	0,5 mg	1,21239*	0,000
		1 mg	0,82927*	0,000

B – Análise Estatística do estudo de degradação do metalaxil no solo após a inoculação dos fungos seleccionados

Tabela IV.11 - Análise da variância (ANOVA II de efeitos fixos com interacção) da taxa de degradação do metalaxil após a adição dos inóculos dos fungos seleccionados em amostras de solo com e sem população autóctone.

Variável dependente: Degradação de Metalaxil

Fontes de variação	Soma de quadrados (tipo III)	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Valor de F	Valor de p (Sig.)
Modelo corrigido	0,837	7	0,120	2184389,567	0,000
Intercepção	6,124	1	6,124	111860384,67	0,000
MICROORG	0,601	3	0,200	3660341,312	0,000
POPSOLO	7,069E-02	1	7,069E-02	1291161,792	0,000
MICROORG * POPSOLO	0,165	3	5,509E-02	1006180,414	0,000
Erro (dentro dos grupos)	1,314E-06	24	5,475E-08		
Total	6,961	32			

(MICROORG – microrganismo adicionado ao solo : *Gongronella* sp.; *Rhizopus stolonifer* e inóculo misto (1:1)

(POPSOLO- população microbiana existente no solo: solo com microrganismos e solo sem população residente)

Tabela IV.12 - Valores médios e diferenças significativas para $p < 0,01$ das taxas de degradação do metalaxil nas amostras de solo consoante a população microbiana presente

Testes de comparação múltipla

Variável dependente: Taxa de degradação

	(I) Inóculo adicionado	(J) Inóculo adicionado	Média da diferença (I-J)	Sig. (99%)
Tukey HSD		<i>R. stolonifer</i>	2,578E-02*	0,000
	<i>Gongronella</i> sp.	<i>Gongronella</i> + <i>R. stolonifer</i>	4,778E-02*	0,000
		Solo sem inóculo	0,289600*	0,000
		<i>Gongronella</i> sp.	2,578E-02*	0,000
	<i>R. stolonifer</i>	<i>Gongronella</i> + <i>R. stolonifer</i>	2,200E-02*	0,000
		Solo sem inóculo	0,315381*	0,000
		<i>Gongronella</i> sp.	4,778E-02*	0,000
	<i>Gongronella</i> + <i>R. stolonifer</i>	<i>R. stolonifer</i>	2,200E-02*	0,000
		Solo sem inóculo	0,337380*	0,000
	Solo sem adição de inóculo (população residente)	<i>Gongronella</i> sp.	-0,289600*	0,000
		<i>R. stolonifer</i>	-0,315381*	0,000
		<i>Gongronella</i> + <i>R. stolonifer</i>	-0,337380*	0,000

