

KENNEDY FERNANDES MARTINS

**DETERMINAÇÃO DA POPULAÇÃO DE FUNGOS E BACTÉRIAS DO
SOLO CONTAMINADO COM PETRÓLEO E ARMAZENADO SOB
REFRIGERAÇÃO E CONGELAMENTO**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, do Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Ciência do Solo, Departamento de Solos do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Pereira de Campos Carvalho

**CURITIBA
2002**

DEDICO

Aos meus filhos **JOÃO MIGUEL** e **JOÃO PEDRO**,

que me fazem sempre querer ser uma pessoa melhor.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer ao Professor Francisco José Pereira de Campos Carvalho, por ter aceitado assumir minha orientação em um momento decisivo durante minha passagem por este curso.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE GRÁFICOS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 MICRORGANISMOS	3
2.1.1 Fungos	3
2.1.2 Bactérias	4
2.2 EFEITO DO ARMAZENAMENTO SOBRE A COMUNIDADE MICROBIANA DO SOLO	6
2.3 NÚMERO MAIS PROVÁVEL NA DETERMINAÇÃO DA POPULAÇÃO MICROBIANA DO SOLO	11
2.3.1 Características gerais	11
2.3.2 Princípios estatísticos do método	12
2.3.2.1 Intervalo de confiança para o NMP	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 DESCRIÇÃO GERAL DA ÁREA	17
3.2 COLETA E PREPARO DA AMOSTRA	17
3.3 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E QUÍMICAS DA AMOSTRA DE SOLO	18
3.4 APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS	18
3.5 DETERMINAÇÃO DA POPULAÇÃO MICROBIANA	19
3.5.1 Determinação do fator de confiança e limites de confiança.....	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	22
4.2 EFEITO DOS TRATAMENTOS.....	24

4.2.1	Análise dos tratamentos até 49 dias de armazenamento	24
4.2.1.1	Solo refrigerado	24
4.2.1.2	Solo congelado	26
4.2.1.3	Solo congelado com adição de glicerol	28
4.2.1.4	Solo contaminado com petróleo e refrigerado	29
4.2.1.5	Solo contaminado com petróleo e congelado	31
4.2.1.6	Solo contaminado com petróleo e congelado com adição de glicerol	31
4.2.2	Análise dos tratamentos aos 292 dias de armazenamento	32
4.3	COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS	33
4.3.1	Efeito dos tratamentos sobre a população de fungos	34
4.3.1.1	Em solo não contaminado	34
4.3.1.2	Em solo contaminado	34
4.3.2	Efeito dos tratamentos sobre a população de bactérias	36
4.3.2.1	Em solo não contaminado	36
4.3.1.2	Em solo contaminado	38
4.4	EFEITO DO ÓLEO NOS TRATAMENTOS	39
4.4.1	Sobre a população de fungos	39
4.4.2	Sobre a população de bactérias	39
4.5	EFEITO DO GLICEROL NOS TRATAMENTOS	41
4.5.1	Efeito sobre a população de fungos	41
4.5.2	Efeito sobre a população de bactérias	41
5	CONCLUSÕES	43
	REFERÊNCIAS	44
	ANEXOS	47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - FATORES PARA CÁLCULO DO INTERVALO DE CONFIANÇA PARA ESTIMATIVAS DE NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP)	16
TABELA 2 - COMPOSIÇÃO GRANULOMÉTRICA DO SOLO	18
TABELA 3 - ALGUMAS ESPECIFICAÇÕES QUÍMICAS DO SOLO	18
TABELA 4 - VALORES MÉDIOS DA POPULAÇÃO DE FUNGOS NOS TRATAMENTOS ANALISADOS EM TODAS AS DATAS DE DETERMINAÇÃO	22
TABELA 5 - VALORES MÉDIOS DA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS NOS TRATAMENTOS ANALISADOS EM TODAS AS DATAS DE DETERMINAÇÃO	23

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - POPULAÇÃO DE FUNGOS E BACTÉRIAS EM FUNÇÃO DAS DATAS DE AVALIAÇÃO EM SOLO REFRIGERADO.....	25
GRÁFICO 2 - POPULAÇÃO DE FUNGOS E BACTÉRIAS EM FUNÇÃO DAS DATAS DE AVALIAÇÃO EM SOLO CONGELADO.....	25
GRÁFICO 3 - POPULAÇÃO DE FUNGOS E BACTÉRIAS EM FUNÇÃO DAS DATAS DE AVALIAÇÃO EM SOLO CONGELADO COM ADIÇÃO DE GLICEROL.....	27
GRÁFICO 4 - POPULAÇÃO DE FUNGOS E BACTÉRIAS EM FUNÇÃO DAS DATAS DE AVALIAÇÃO EM SOLO CONTAMINADO COM ÓLEO E REFRIGERADO.....	27
GRÁFICO 5 - POPULAÇÃO DE FUNGOS E BACTÉRIAS EM FUNÇÃO DAS DATAS DE AVALIAÇÃO EM SOLO CONTAMINADO COM ÓLEO E CONGELADO.....	30
GRÁFICO 6 - POPULAÇÃO DE FUNGOS E BACTÉRIAS EM FUNÇÃO DAS DATAS DE AVALIAÇÃO EM SOLO CONTAMINADO COM ÓLEO E CONGELADO COM ADIÇÃO DE GLICEROL.....	30
GRÁFICO 7 - POPULAÇÃO DE FUNGOS E BACTÉRIAS AOS 292 DIAS DE ARMAZENAMENTO EM TODOS OS TRATAMENTOS.....	33
GRÁFICO 8 - POPULAÇÃO DE FUNGOS EM SOLO NÃO CONTAMINADO SOB REFRIGERAÇÃO, CONGELAMENTO E CONGELAMENTO COM ADIÇÃO DE GLICEROL, OBTIDA ATRAVÉS DA EQUAÇÃO DADA PELA REGRESSÃO DOS PONTOS OBSERVADOS.....	35
GRÁFICO 9 - POPULAÇÃO DE FUNGOS EM SOLO CONTAMINADO SOB REFRIGERAÇÃO, CONGELAMENTO E CONGELAMENTO COM ADIÇÃO DE GLICEROL, OBTIDA ATRAVÉS DA EQUAÇÃO DADA PELA REGRESSÃO DOS PONTOS OBSERVADOS.....	35
GRÁFICO 10 - POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS EM SOLO NÃO CONTAMINADO SOB REFRIGERAÇÃO, CONGELAMENTO E CONGELAMENTO COM ADIÇÃO DE GLICEROL, OBTIDA ATRAVÉS DA EQUAÇÃO DADA PELA REGRESSÃO DOS PONTOS OBSERVADOS.....	37
GRÁFICO 11 - POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS EM SOLO CONTAMINADO SOB REFRIGERAÇÃO, CONGELAMENTO E CONGELAMENTO COM ADIÇÃO DE GLICEROL, OBTIDA ATRAVÉS DA EQUAÇÃO DADA PELA REGRESSÃO DOS PONTOS OBSERVADOS.....	37
GRÁFICO 12 - PERCENTAGEM DA POPULAÇÃO DE FUNGOS NOS TRATAMENTOS COM ÓLEO EM RELAÇÃO AOS MESMOS TRATAMENTOS SEM ÓLEO, EM FUNÇÃO DOS DIAS DE ARMAZENAMENTO.....	40
GRÁFICO 13 - PERCENTAGEM DA POPULAÇÃO DE FUNGOS NOS TRATAMENTOS COM ÓLEO EM RELAÇÃO AOS MESMOS TRATAMENTOS SEM ÓLEO, EM FUNÇÃO DOS DIAS DE ARMAZENAMENTO.....	40
GRÁFICO 14 - PERCENTAGEM DA POPULAÇÃO DE FUNGOS NOS TRATAMENTOS COM GLICEROL EM RELAÇÃO AOS MESMOS TRATAMENTOS SEM GLICEROL, EM FUNÇÃO DOS DIAS DE ARMAZENAMENTO.....	42
GRÁFICO 15 - PERCENTAGEM DA POPULAÇÃO DE FUNGOS NOS TRATAMENTOS COM GLICEROL EM RELAÇÃO AOS MESMOS TRATAMENTOS SEM GLICEROL, EM FUNÇÃO DOS DIAS DE ARMAZENAMENTO.....	42

DETERMINAÇÃO DA POPULAÇÃO MICROBIANA DO SOLO CONTAMINADO COM PETRÓLEO, SOB REFRIGERAÇÃO E CONGELAMENTO

RESUMO

Em estudos microbiológicos do solo, as condições de armazenamento das amostras antes da análise podem ser decisivas para os resultados. Estudos realizados sobre amostras coletadas recentemente do solo são geralmente preferidas, porém, por razões práticas isto nem sempre é possível. Os métodos mais comuns usados para o armazenamento de solo são a refrigeração ou congelamento de amostras de solo úmido. Existem, no entanto, estudos que alertam contra qualquer tipo de armazenamento, enquanto que outros estudos não indicam qualquer prejuízo em fazê-lo. Neste estudo a refrigeração e o congelamento com ou sem estabilizador de membrana celular foram testados como forma de armazenamento por até 292 dias, em solo com e sem contaminação por petróleo. Os efeitos do armazenamento foram avaliados sobre a população de fungos e bactérias. Os resultados mostraram que os efeitos do congelamento são geralmente menores do que aqueles da refrigeração e que esta última não deve ser recomendada como forma de armazenamento de solo contaminado com petróleo.

**DETERMINATION OF FUNGI AND BACTERIA POPULATION IN SOIL
CONTAMINATED WITH PETROLEUM AND STORAGE UNDER
REFRIGERATION AND FREEZING**

ABSTRACT

In soil microbiological studies, the storage conditions of the soil samples prior to analysis may be decisive for the results. Studies made on freshly collected soils are generally preferred but these are not always possible for practical reasons. The most commonly used methods to store soils for microbiological analysis are refrigeration or freezing of field moist soil. There are, however, studies that warn against any kind of storage, although other studies do not indicate any drawbacks to it. In this study the refrigeration and freezing with or without cell membrane stabilizer, were tested in storage until 292 days, in soil with or without petroleum contamination. The storage effects were assessed on fungi and bacteria population. The results showed that the effects of freezing generally were smaller than those of refrigeration and that this last do not be recommended to storage of soil contaminated with petroleum.

1 INTRODUÇÃO

Quando ocorre uma contaminação ambiental com as proporções do vazamento de petróleo da refinaria Presidente Getúlio Vargas, município de Araucária, estado do Paraná, há necessidade da aplicação de medidas reparatórias ou compensatórias. Neste caso, um dos impactos ocasionados pelo acidente foi a contaminação do solo com óleo proveniente do vazamento da refinaria. Para que seja possível qualificar e quantificar as medidas reparatórias a serem tomadas, faz-se necessário um levantamento do impacto no solo por esta contaminação. Uma das formas de avaliação do impacto causado é através do monitoramento das mudanças nas suas propriedades físicas, químicas e biológicas.

Além disso, são cada vez mais freqüentes estudos que utilizam mudanças na atividade e na biomassa dos microrganismos dos solos, como forma de avaliação de impactos como o ocorrido através do vazamento, ou seja, utilizando-os como bioindicadores. Isto é possível em função da importância dos processos e transformações realizados pelos microrganismos do solo, processos estes que são parte integrante dos ciclos biogeoquímicos de elementos químicos como carbono, oxigênio e nitrogênio através de ecossistemas terrestres, aquáticos e da atmosfera.

Para a realização deste monitoramento na área contaminada em questão, tornou-se necessário a coleta de um grande número de amostras para garantir a representatividade da área em estudo. Este grande número de amostras tornou-se um problema no momento das análises, principalmente microbiológicas, devido à pequena capacidade operacional dos laboratórios de microbiologia do solo. Assim sendo o armazenamento de amostras para a realização posterior das análises tornou-se inevitável.

Na realização de certas análises físicas e químicas as condições de armazenamento prévio das amostras antes do processamento das análises não são tão decisivas. Porém, quando se trata do monitoramento da atividade microbiana, as

condições de armazenamento das amostras coletadas no campo, até o processamento das análises no laboratório, podem ser decisivas para os resultados.

Para o estudo da atividade microbiana nos solos, análises realizadas em amostra de solo fresco, coletadas diretamente do campo, são geralmente preferidas. Entretanto, por razões práticas, como as citadas anteriormente, isto nem sempre é possível. Portanto, quando a análise em solo fresco é impraticável, o armazenamento das amostras, para processamento posterior, torna-se inevitável. Neste caso, a utilização de amostras refrigeradas ($+2^{\circ}\text{C}$ a $+4^{\circ}\text{C}$) e amostras congeladas (-15°C a -20°C) como forma de armazenamento, são as recomendações mais comuns. Porém, estas recomendações foram desenvolvidas com base em estudos realizados em solos sem o tipo de interferência como causada pela contaminação com petróleo.

Assim sendo, este trabalho teve por objetivo determinar, a melhor forma de armazenamento de amostras destinadas à determinação da população de fungos e bactérias heterotróficos de um solo contaminado com petróleo e que está sendo objeto de monitoramento.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MICRORGANISMOS

2.1.1 Fungos

Por possuírem células eucarióticas os fungos são considerados protistas superiores. Todos os fungos são heterotróficos, aclorofilados e, portanto, não realizam fotossíntese. Para obtenção de seu alimento eles agem como sapróbios (vivem sobre a matéria orgânica proveniente de organismos mortos), como parasitas ou participando de associações mutualísticas (liquens e micorrizas). A maioria dos fungos é multicelular, com estruturas de crescimento filamentosas denominadas hifas. Entretanto, existem também fungos unicelulares, que são chamados popularmente de leveduras. Como exemplo de fungos unicelulares podem ser citados os gêneros *Sacharomyces*, *Candida*, e *Torula*, e entre os pluricelulares, os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Chaetomium*, *Fusarium* e *Trichoderma*.

Segundo THORN (1997), a dominância da maioria dos solos pelos fungos é impressionante, seja pelo número de espécies, comprimento das hifas (100-1000 m g⁻¹ de solo seco), ou por sua biomassa (37-184 g de micélio por m²).

Já BRANDÃO (1992), cita que os fungos no solo, apresentam-se em densidades populacionais inferiores a das bactérias, podendo variar entre 10⁴ a 10⁶/g de solo, mas, devido ao elevado comprimento e diâmetro das hifas, podem contribuir com uma biomassa de até 5 ton ha⁻¹.

ANDERSON e DOMSCH (1978) e NANNIPIERI (1978), também destacam a dominância da biomassa dos fungos nos solos, e citam que esta pode superar a de todos os outros microrganismos, plantas e animais juntos.

Por outro lado, YANG (1991), através de estudos em solos tropicais, estimou a biomassa fúngica em um terço da biomassa bacteriana.

Assim sendo, estes microrganismos, embora em menor número que as bactérias, geralmente contribuem com a maior parcela da biomassa microbiana do solo. Esta biomassa pode representar uma significativa porção dos nutrientes do solo, e sua atividade pode ser a chave da disponibilidade ou não destes nutrientes para as plantas (THORN, 1997).

Segundo PELCZAR et al. (1980), as populações fúngicas são predominantes em solos ácidos, onde sofrem menor competição, já que as bactérias são favorecidas por valores de pH na faixa neutra a alcalina. Podem ser encontrados em solos com pH de 2,0 a 9,0, e o valor ótimo para o desenvolvimento depende da espécie.

Após a calagem e elevação do pH as densidades populacionais fúngicas decrescem, em consequência da competição com populações de bactérias (SIQUEIRA et al., 1994).

A umidade ideal para as populações fúngicas está localizada entre 60 a 70 % da capacidade de campo. São geralmente aeróbios e apresentam resistência a altas pressões de CO₂, podem se desenvolver nas regiões mais profundas do solo e podem ser encontrados em uma ampla faixa de temperatura (BRANDÃO, 1992).

Os fungos também apresentam habilidade de crescimento sob condições amplas, sendo que alguns, como algumas linhagens de *Cladosporium herbarum*, podem crescer a temperaturas tão baixas quanto -6°C. Em contraste, outras espécies, como algumas pertencentes ao gênero *Chaetominum*, crescem numa temperatura ótima de 50°C e sobrevivem mesmo até 60°C (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1996).

2.1.2 Bactérias

São organismos procarióticos de estrutura simples e, dentre microrganismos do solo, são os menores fisicamente e os mais abundantes em termos de número de

indivíduos. Suas células são bastante pequenas, geralmente medindo 1 a 10 micrômetros de diâmetro, bem menor do que a maioria das células eucarióticas, que medem 10 a 100 micrômetros, o que, comparativamente, reflete uma enorme diferença no volume. As bactérias, em sua maioria, são heterotróficas - organismos que necessitam de nutrientes orgânicos pré-formados como fonte de energia e de carbono. Porém, existem também bactérias autotróficas - sintetizam compostos orgânicos a partir de inorgânicos precursores, seja por fotossíntese ou por quimiossíntese. A principal forma de reprodução é a fissão binária (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1996).

Para ARAÚJO e HUNGRIA (1994), a maior densidade populacional entre os microrganismos dos solos é promovida pelas bactérias, que é superior à densidade de todos os outros microrganismos juntos. Ainda segundo os mesmos autores a comunidade bacteriana é estimada em cerca de 10^8 a 10^9 por grama de solo, podendo variar com a técnica de contagem e o tipo de solo analisado. Embora apareçam em altas densidades populacionais nos solos, as bactérias, devido ao reduzido tamanho celular, contribuem com menos da metade da biomassa microbiana total.

ANDERSON e DOMSCH (1980), em estudo realizado em 17 solos diferentes, observaram que a contribuição das bactérias para a biomassa microbiana foi estimada entre 10 a 40 %, sendo a média 25 %, entretanto, a participação dos fungos foi bem maior e variou de 60 a 90 %, sendo a média de 75 % .

De acordo SIQUEIRA et al. (1994), as bactérias podem ser classificadas de acordo com as exigências de oxigênio em:

- a) aeróbias: necessitam de oxigênio;
- b) microaerófilas: exigem pequenas quantidades de oxigênio livre;
- c) anaeróbias propriamente ditas: crescem na ausência do oxigênio; e
- d) anaeróbias facultativas: crescem tanto na presença quanto na ausência de oxigênio livre.

Segundo BRANDÃO (1992), os gêneros de maior ocorrência no solo são: *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*; *Bacillus* e *Xanthomonas*. Também foram detectados outros gêneros menos representativos que possuem grande importância agrícola e ecológica são: *Ferrobacillus*, *Thiobacillus*, *Hidrogenomonas*, *Dessulfovibrio*, *Methanobacillus*; *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*, que atuam no processo de nitrificação; *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, que participam da fixação biológica do nitrogênio através de mutualismo com leguminosas; *Parosponia*; *Azospirillum* que fixam nitrogênio com gramíneas; e *Beijerinckia*, *Azotomonas*, *Dexia* e outros gêneros que são fixadores de vida livre no solo.

ALEXANDER (1980), através de estudos com contagens em placas de Petri, cita que alguns gêneros podem ser encontrados no solo nas seguintes proporções: *Arthrobacter*: 5 a 60%, *Bacillus*: 7 a 67%, *Pseudomonas*: 3 a 15%, *Agrobacterium*: acima de 20% e *Flavobacterium*: 2 a 10%.

GRAY e WILLIAMS (1975); RAVEN, EVERT e EICHHORN, (1996), citam que certos grupos de bactérias do solo, dentre os quais estão os gêneros *Bacillus* e *Clostridium*, são capazes de sobreviver em condições adversas do ambiente, como: dessecação prolongada; altas temperaturas; irradiação e substâncias tóxicas, pela formação do endosporo, que é uma estrutura mais resistente do que a célula vegetativa.

Segundo RAVEN, EVERT e EICHHORN (1996), a capacidade que certas bactérias possuem de decompor substâncias sintéticas, tais como petróleo, pesticidas e tintas, pode levar a um amplo emprego destes organismos na limpeza de derramamentos e decomposição de lixo, quando as técnicas de utilização destas bactérias estiverem mais desenvolvidas.

2.2 EFEITO DO ARMAZENAMENTO SOBRE A COMUNIDADE MICROBIANA DO SOLO

Em estudos microbiológicos dos solos, muitas vezes não é possível o

processamento das análises logo após a coleta, o que seria preferível. Portanto, o armazenamento sob a forma de amostras refrigeradas ou congeladas estão entre as opções recomendadas (WOLLUM, 1994; HART et al., 1994).

Esta colocação é importante em função da necessidade de esclarecer a diferença entre o que é o efeito do armazenamento de amostras, sejam refrigeradas ou congeladas, sobre as células microbianas e o que é efeito sobre as propriedades físicas e químicas dos solos, já que tais efeitos, principalmente a desagregação física, podem interferir na eficiência de extração dos microrganismos da amostra de solo em alguns métodos utilizados em microbiologia.

Segundo MacLEOD e CALCOTT (1976), o dano causado nos microrganismos pelo congelamento das amostras de solo pode ser explicado pelo fato de que alguns organismos, quando à temperaturas em torno de -16°C tornam-se muito frios, porém não congelam. Nesta situação a membrana celular destas células tornam-se excessivamente permeáveis, e quantidades relativamente grandes de íons e solutos orgânicos saem da célula, provocando sua morte. Ainda segundo os mesmos autores, a morte dos microrganismos também pode ser causada por formação intracelular de cristais de gelo e em função da pressão osmótica exercida pela formação de cristais de gelo na fase líquida do solo, o que provocaria uma plasmólise irreversível nas células microbianas.

Alguns autores publicaram trabalhos reportando o efeito negativo do congelamento sobre a população de microrganismos do solo, avaliado através diferentes técnicas de observação direta e indireta.

SOULIDES e ALLISON (1961), analisaram o efeito do congelamento sobre a população microbiana em 4 solos com diferentes características físicas e químicas, através de contagens de microrganismos viáveis em placas de Petri. Eles obtiveram resultados que mostraram uma redução da população microbiana, que variou de 14% a 44% em relação às mesmas medidas realizadas em solo não congelado. As reduções observadas mostraram-se diretamente proporcionais à umidade dos solos.

SKOGLAND et al. (1988), através de um experimento de análise dos efeitos do congelamento e descongelamento sobre as bactérias do solo, demonstraram uma diminuição da população de bactérias em contagens em placa. Demonstraram também, que esta diminuição da população de bactérias foi inversamente proporcional à respiração do solo. Os autores concluíram que o congelamento (-7°C) por 24 horas, provocou a morte de uma parcela dos organismos do solo, incluindo as bactérias, que foram metabolizadas por microrganismos sobreviventes, o que conseqüentemente provocou aumento na atividade respiratória.

ZELLES et al. (1991), em experimento realizado com vários solos armazenados a -140 , -18 e 4°C , concluiu que a preservação de indicadores da atividade microbiana no solo, como a análise dos níveis ácido murâmico para bactéria e ergosterol para fungos, não foi satisfatória.

SHISHIDO e CHANWAY (1998), em estudo realizado com três solos diferentes, observaram uma redução significativa da população de microrganismos do solo durante o armazenamento, tanto a 4°C , quanto a -10°C , durante 32 semanas. O armazenamento a 4°C reduziu significativamente o número de bactérias, enquanto que para fungos a temperatura de -10°C foi mais prejudicial, embora as diferenças não tenham sido significantes.

Alguns autores como JENKINSON e POWLSON (1976); ROSS et al. (1980) e LADD et al. (1981) têm utilizado amostras de solo congelado em seus estudos sobre biomassa microbiana.

ANDERSON (1987), mostrou que a temperatura de armazenamento tem grande influência sobre a sobrevivência da biomassa microbiana no solo quando analisada pelo método da respiração induzida pelo substrato. Neste experimento, o armazenamento por 70 dias a 22°C resultou em uma perda de 39% da biomassa, e quando armazenado pelo mesmo período a 2°C a perda foi de apenas 18%.

Em experimento semelhante, ROSS (1991) observou uma redução de 39% da biomassa microbiana, em solo armazenado a 4°C por 14 meses. Este resultado

também foi obtido através do método da respiração induzida pelo substrato. Para as medições de biomassa microbiana realizadas por fumigação-incubação e fumigação extração, as diferenças não foram significativas.

WINTER et al. (1994) mediram o efeito do armazenamento com solo congelado a -15°C por até 170 dias sobre a biomassa microbiana medida pelo método da fumigação-extração (CFE) e mostraram que este parâmetro não foi significativamente afetado. Porém, os próprios autores admitiram que a mortalidade microbiana pode ter sido mascarada pelo aumento da eficiência do método (40%), provocado pela desagregação do solo congelado. Em conclusão, não recomendaram o uso de amostras previamente congeladas na determinação da biomassa microbiana através do método testado.

VERCHOT (1999), avaliou o impacto do armazenamento de um solo de clima tropical a 4°C por cinco dias, sobre seu potencial de nitrificação. O autor concluiu que o procedimento adotado reduziu significativamente o potencial de nitrificação nas incubações realizadas.

Porém, em alguns casos, aumento na população bacteriana também tem sido observado.

MACK (1962), em estudo onde foram testadas quatro formas de armazenamento, obteve resultados de aumento da população bacteriana nos tratamentos onde o solo foi congelado. Porém, este resultado foi obtido com o armazenamento a temperaturas muito baixas, em torno de -196°C em nitrogênio líquido. Isto significa que o congelamento ocorreu rapidamente, o que poderia provocar uma maior sobrevivência destes microrganismos. O aumento da população bacteriana observado não reflete, segundo o próprio autor, aumento real do número de bactérias na amostra e teria ocorrido em função de uma melhoria da extração causada pela desagregação do solo durante o congelamento.

Este aumento da eficiência de extração causado pela desagregação do solo está de acordo com o observado por LEHRSCHE et al. (1991), que estudou as

conseqüências do congelamento sobre a estabilidade dos agregados do solo e apresentou como sua principal conclusão a diminuição linear da estabilidade destes agregados em função do aumento do conteúdo de água da amostra quando congelada.

Resultados semelhantes foram observados por EDWARDS e CRESSER (1992). Eles observaram um aumento do nitrogênio mineral extraído de amostras congeladas quando comparadas com medições feitas com solo não congelado. O aumento observado nas amostras congeladas foi atribuído à exposição de novas superfícies pela força da formação de cristais de gelo.

BIEDERBECK e CAMPBELL (1971), assim como MacLEOD e CALCOTT (1976), afirmam que diversos fatores podem interferir na mortalidade microbiana em amostra armazenadas sob refrigeração ou congelamento. Entre estes fatores estão a temperatura de armazenamento, taxa de congelamento e descongelamento, situação nutricional microbiana, tempo de armazenamento e pré-processamento das amostras como secagem e umedecimento.

Ainda segundo MacLEOD e CALCOTT (1976), a taxa de congelamento e descongelamento das amostras tem especial influência na sobrevivência dos microrganismos, sendo que taxas lentas, podem resultar em grande perdas microbianas. Além disso, células ativas parecem ser bem mais sensíveis ao processo de congelamento e descongelamento do que células menos ativas.

Entretanto, outros autores têm mostrado que alguns parâmetros usados para a caracterização da comunidade microbiana, assim como a atividade enzimática, biomassa microbiana, número de microrganismos, permanecem relativamente constantes durante o período de armazenamento.

Por exemplo, PETERSEN e KLUG (1994), através de estudos nos quais foi utilizada a de detecção de fosfolipídeos como indicativo do tamanho da comunidade microbiana, conclui que o armazenamento de amostras a 4,5°C por 21 dias não alterou significativamente esta comunidade.

Em outro exemplo, STENBERG et al. (1998) compararam vários processos microbiológicos em amostras de 12 diferentes tipos de solo armazenadas sob refrigeração a 2°C e sob congelamento a -20°C por até 13 meses. Eles mostraram que longos períodos sob refrigeração (2°C) resultaram na diminuição da biomassa microbiana, respiração basal, potencial de oxidação de amônio, e potencial de desnitrificação, porém, com exceção da respiração basal, estas propriedades permaneceram inalteradas nos solos armazenados congelados (-20°C).

2.3 NÚMERO MAIS PROVÁVEL NA DETERMINAÇÃO DA POPULAÇÃO MICROBIANA DO SOLO

2.3.1 Características gerais

Uma das grandes dificuldades nos estudos microbiológicos dos solos é que nem sempre existe a possibilidade de observação direta dos parâmetros que se quer avaliar, ou, o que também é comum, observações diretas são possíveis mas nem sempre são aplicáveis na prática. (STOTZKI, 1997).

A técnica do número mais provável é um método utilizado para obtenção de uma estimativa do tamanho da população microbiana. Este método emprega o conceito da diluição à extinção, ou seja, amostras são submetidas à diluições sucessivas, sendo que, de cada diluição são retiradas alíquotas para inoculação em meio de cultura apropriado, utilizando-se várias repetições. Os resultados iniciais são obtidos através da caracterização do desenvolvimento (positivo) ou não desenvolvimento (negativo) de microrganismos nas repetições de cada uma das diluições (ALEXANDER, 1982).

A técnica do número mais provável continua sendo um importante método de determinação da população microbiana no solo. Este método tem uma grande vantagem sobre os métodos de observação direta como a microscopia, pois estima apenas as células vivas capazes de se desenvolver, prevenindo assim, resultados que

possam superestimar a população microbiana, o que é comum nos métodos diretos (WELLINGTON et al., 1997).

Um importante aspecto da metodologia do número mais provável é a habilidade de estimar o tamanho da população de certos grupos microbianos baseando-se em atividades específicas destes grupos (WOOMER, 1994).

A caracterização do desenvolvimento microbiano pode ser baseada na turvação do meio de cultura, ou através de atividade metabólica específica, como por exemplo, aquela evidenciada pelo desaparecimento de algum substrato ou formação de algum produto. Assim sendo, entre as aplicações possíveis desta técnica estão a estimativa da população de bactérias nitrificantes (*Nitrossomonas* e *Nitrobacter*), e de células viáveis de rizóbio (CARTER, 1993).

Ainda segundo CARTER (1993), a metodologia do número mais provável também pode ser utilizada na estimativa da população total de microrganismos heterotróficos de amostras de solo em procedimento similar ao método de contagem em placas, exceto pelo fato das alíquotas retiradas das diluições serem inoculadas em tubos contendo meio de cultura líquido.

2.3.2 Princípios estatísticos do método

Os resultados de desenvolvimento positivo ou negativo observados nas inoculações são utilizados para derivar a estimativa da população de microrganismos através de princípios matemáticos.

É importante lembrar que, assim como em outras formas de análise estatística, a estimativa da densidade de células viáveis na amostra de solo pelo método do número mais provável, baseia-se, segundo COCHRAN (1950), em duas premissas:

- 1- os organismos presentes na diluição inicial e nas diluições subsequentes devem apresentar distribuição homogênea e aleatória;

2- não deve existir interação entre os organismos presentes na solução.

ANDRADE e HAMAKAWA (1994), citam que, após admitir que as premissas são satisfeitas, da diluição inicial pode-se proceder as diluições subseqüentes utilizando-se, normalmente, o mesmo número de repetições para cada volume, e volumes regularmente espaçados. Mas, segundo os mesmos autores, essa regularidade não é necessariamente pré-requisito metodológico experimental ou estatístico. Isto porque, após o procedimento experimental, supondo "k" representando diferentes volumes, o resultado será:

$$\sum_{i=1}^k S_i V_i + \sum_{i=1}^k F_i V_i = \sum_{i=1}^k N_i V_i \quad (1)$$

onde:

i é o número de diluições, ou de volumes diferentes;

N_i é o número de repetições com volume V_i ;

V_i é o volume retirado na diluição i reportado à diluição inicial;

S_i é o número de sucessos (positivos) na diluição i ;

F_i é o número de fracassos (negativos) na diluição i .

Quando a solução ou suspensão é diluída, a probabilidade de não haver nenhum organismo viável na amostra com volume V_i é dada aproximadamente, por:

$$p(F_i) = e^{-V_i d} \quad (2)$$

onde "d" é a densidade de organismos na diluição inicial e "e" representa o logaritmo natural.

Desenvolvendo-se a equação (1) e nela substituindo a equação (2), chega-se à equação proposta por COCHRAN (1950):

$$\sum_{i=1}^k F_i V_i = \sum_{i=1}^k \frac{S_i V_i e^{-V_i d}}{1 - e^{-V_i d}} \quad (3)$$

Esta equação não tem solução analítica, mas pode ser encontrado o valor de "d" por interação. Outra forma de se chegar a essa resolução é lembrar que a equação (2) aproxima-se da função de probabilidades de Poisson, que é caso particular da função distribuição de probabilidades binomial, onde a probabilidade de ocorrência dos eventos de sucessos $S_1, S_2, S_3, \dots, S_k$, para uma diluição inicial será dada por:

$$p(S_1, S_2, S_3, \dots, S_k) = \sum_{i=1}^k \left(\frac{N_i}{S_i} \right) (1 - e^{-v_i d}) S_i (e^{-v_i d}) F_i \quad (4)$$

Também por interação, os valores de "d" obtidos por (3) e (4) igualam-se quando a probabilidade for máxima. Esta é a explicação para o valor de "d" ser denominado "Número Mais Provável, NMP".

Para a aplicação da equação (4), é necessário que os resultados experimentais, para uma determinada série de diluições, submetam-se a duas condições:

- a) ao menos em um caso deve ocorrer desenvolvimento microbiano;
- b) ao menos em um caso não deve ocorrer desenvolvimento microbiano.

Ainda segundo ANDRADE e HAMAKAWA (1994), e WOOMER (1994), algumas questões devem ser discutidas quanto ao método do número mais provável.

O princípio básico do método admite que, se existir uma única célula na alíquota inoculada capaz de se desenvolver, isto ocorrerá. Ocorrendo a desenvolvimento, significa que existe ao menos uma célula viável. Ao contrário, se não ocorrer desenvolvimento, não se pode afirmar a inexistência das células, o que desloca a maneira de analisar os eventos. Do ponto de vista matemático, o princípio básico do método é determinista, sendo expresso pela equação (3), enquanto a perspectiva probabilística é visualizada pela equação (4).

Outro aspecto que deve ser observado é que pela abordagem determinista, para um determinado resultado experimental válido, chega-se a um valor único de

densidade de células viáveis. Como são utilizadas tabelas para se obter o NMP, conclui-se que a densidade é uma variável discreta, ou seja, apenas alguns valores são possíveis. Deve também ser lembrado que a densidade é definida como número de células viáveis por unidade de massa ou volume, podendo assumir qualquer valor positivo, do conjunto de números reais. Assim, as densidades e as tabelas tornam-se aparentemente incompatíveis.

Ainda segundo os autores citados anteriormente, essa incompatibilidade é explicada pela abordagem probabilística, onde o valor da densidade de células viáveis é obtido pela sua probabilidade de ocorrência. Dessa forma, um resultado experimental pode ser consequência de um conjunto de valores possíveis de densidade. E cada valor possível está associado a uma probabilidade, as vezes próxima do valor mais provável. Portanto, o experimentador não deve ter em mente apenas o número mais provável, mas também, seu intervalo de confiança com algum nível de certeza.

2.3.2.1 Intervalo de confiança para o NMP

O erro padrão, intervalo de confiança e testes de comparação entre duas estimativas de populações foram estabelecidos inicialmente por COCHRAN (1950).

Vários trabalhos, entre os mais recentes: LOYER e HAMILTON (1987), RIDOUT (1994) e WOOMER (1994), foram publicados posteriormente discutindo a importância do intervalo de confiança nas estimativas utilizando NMP.

Segundo WOOMER (1994), o cálculo para estabelecer o fator de confiança (FC) utiliza como base a taxa de diluição adotada e o número de repetições em cada nível de diluição, e pode ser determinado através das equações:

$$FC_{0.05} = \text{antilog}_{10} \left\{ 2 \times 0.58 \times \sqrt{[(\log_{10} a)/n]} \right\} \text{ quando } a \geq 10 \quad (5)$$

$$FC_{0.05} = \text{antilog}_{10} \left\{ 2 \times 0.55 \times \sqrt{[(\log_{10} a)/n]} \right\} \text{ quando } a < 10 \text{ e,} \quad (6)$$

onde:

a é a taxa de diluição

n é o número de repetições por nível de diluição.

Para se determinar o limite máximo do intervalo de confiança de uma estimativa obtida através das tabelas disponíveis, multiplica-se a estimativa pelo FC, e para determinar o limite mínimo a estimativa deve ser dividida pelo FC.

É interessante destacar que taxas de diluição menores juntamente com um número maior de repetições por nível de diluição resultam numa redução do FC, aumentando assim a resolução da estimativa da população. Alternativamente, taxas de diluição maiores juntamente com um pequeno número de repetições, resultam num aumento do FC, diminuindo a resolução da estimativa.

Existem algumas tabelas que apresentam fatores de confiança previamente calculados para diversas taxas de diluição e vários números de repetições. Segue abaixo um exemplo citado por WOOMER et al. (1994).

TABELA 1 - FATORES PARA CÁLCULO DO INTERVALO DE CONFIANÇA PARA ESTIMATIVAS DE NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP)

Repetições por diluição	Fator para 95% de intervalo de confiança em várias taxas de diluição ⁽¹⁾				
	2	3	4	5	10
1	4.01	5.75	7.14	8.31	14.45
2	2.67	3.45	4.01	4.47	6.61
3	2.23	2.75	3.11	3.40	4.67
4	2.00	2.40	2.67	2.88	3.80
5	1.86	2.19	2.41	2.58	3.30
6	1.76	2.04	2.23	2.37	2.98
7	1.69	1.94	2.10	2.23	2.74
8	1.63	1.86	2.00	2.11	2.57
9	1.59	1.79	1.93	2.03	2.44
10	1.55	1.74	1.86	1.95	2.33

⁽¹⁾ A estimativa do NMP deve ser multiplicada por e dividida pelo fator para estabelecer o limite superior e inferior do intervalo de confiança ($p = 0.05$), respectivamente.

Para duas estimativas da densidade populacional serem consideradas significativamente diferentes uma da outra, o limite inferior da estimativa mais alta deve ser maior do que o limite superior da estimativa mais baixa. A resposta obtida depende do arranjo experimental proposto (número de repetições, diluições), o que torna o intervalo de confiança de extrema importância na comparação dos resultados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DESCRIÇÃO GERAL DA ÁREA

O solo utilizado neste estudo foi coletado em uma área de reflorestamento localizada no município de Araucária, região metropolitana de Curitiba. Esta área situa-se na porção centro-sul do primeiro planalto paranaense, próxima às coordenadas 25°34'02,5" S e 49°20'53,5" W, e em uma altitude média de 920 metros.

O clima regional, segundo a classificação de Koeppen, é do tipo Cfb - temperado, com verões frescos, geadas frequentes, sem estação seca definida, com médias anuais de temperatura do mês mais quente inferior a 22°C e do mês mais frio inferior a 18°C.

Segundo dados provenientes da estação meteorológica de Piraquara, cuja localização retrata a região estudada, a temperatura média anual é de 16,5°C, a temperatura média do mês mais frio é de 12,7°C (julho) e a do mês mais quente 20,3°C (fevereiro), com temperaturas mínimas atingindo valores inferiores a -5°C e com máximas superiores a 33°C. Conforme MAACK (1981), a formação de geadas é bastante comum na região, embora o número de ocorrências possa variar muito de um ano para o outro indo desde duas até mais de 20.

A região apresenta uma precipitação média anual de 1400 mm. Historicamente, o verão apresenta os meses de maior precipitação, e as chuvas na região são bem distribuídas durante o ano, o que em parte determina uma umidade relativa do ar média em torno de 85%.

3.2 COLETA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

O solo coletado é oriundo de uma área de reflorestamento localizada ao lado de uma área que sofreu contaminação com óleo proveniente de um vazamento da

refinaria Presidente Getúlio Vargas. A área amostrada corresponde a 100m², de onde foram coletadas cinco amostras simples na camada de 0 a 20 cm de profundidade por meio de trato holandês. As amostras simples foram misturadas e homogeneizadas para compor uma amostra composta representativa da área.

O solo foi peneirado em malha de 0,5mm e posteriormente seco ao ar, para então ser levado ao laboratório.

3.3 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E QUÍMICAS DA AMOSTRA DE SOLO.

As análises físicas e químicas do solo coletado foram realizadas nos respectivos laboratórios do Departamento de Solos do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, e os resultados são mostrados nas tabelas abaixo.

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO GRANULOMÉTRICA DO SOLO

	%Areia fina	%Areia grossa	%Areia	%Silte	%Argila
Amostra	8	28	36	12	52

TABELA 3- ALGUMAS ESPECIFICAÇÕES QUÍMICAS DO SOLO

PH	Al ⁺³	H+Al	Ca ⁺² +Mg ⁺²	Ca ⁺²	K ⁺	T	P	C	V
CaCl ₂	cmol _c /dm ³						mg/dm ³	g/ dm ³	%
4,00	5,60	15,20	2,60	1,50	0,17	17,97	2,0	29,3	15,4

3.4 APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS

No laboratório, uma alíquota de 300g da amostra composta coletada foi dividida em 6 porções de 50g e acondicionadas em potes de polietileno com tampa rosqueável, para que nelas fossem aplicados os tratamentos. A outra parte foi utilizada para determinar a umidade do solo.

Os tratamentos realizados visaram estabelecer a forma de armazenamento que apresentasse menor impacto sobre a avaliação da população de bactérias e fungos heterotróficos.

Os tratamentos aplicados foram os seguintes:

- 1) solo refrigerado a 4°C, código (r);
- 2) solo congelado a -20°C, código (c);
- 3) solo congelado a -20°C com adição de glicerol, código (cg);
- 4) solo contaminado com óleo e refrigerado a 4°C, código (or);
- 5) solo contaminado com óleo e congelado a -20°C, código (oc);
- 6) solo contaminado com óleo e congelado a -20°C com adição de glicerol, código (ocg).

Os códigos que aparecem no final da descrição de cada tratamento visam facilitar a identificação dos mesmos em citações posteriores, sendo a letra (r) indicativo de solo refrigerado, a letra (c) de solo congelado, (g) de adição de solução de glicerol e (o) indica solo contaminado com óleo. Estes códigos virão precedidos das letras (F) e (B), quando reportarem os efeitos dos tratamentos sobre a população de fungos e bactérias, respectivamente.

A solução de glicerol citada nos tratamentos acima, foi preparada na forma de solução em água, sendo 40% de glicerol para 60% de água. Nos tratamentos 1 e 6 foram adicionados 125 ml desta solução a cada porção de 50 g de solo. O objetivo da utilização da solução de glicerol nas amostras de solo congelado foi testar a eficiência desta substância como estabilizador da membrana celular dos microrganismos, reduzindo assim a mortalidade causada pelo congelamento.

O solo contaminado utilizado nos tratamentos (or), (oc) e (ocg) foi obtido artificialmente no laboratório através da adição de óleo na proporção de 10% da massa do solo, seguida de perfeita homogeneização.

Após a adição do glicerol e ou óleo, os solos foram armazenados em geladeira à temperatura de 4°C para os tratamentos (r) e (or), ou no congelador à temperatura de -20°C para os tratamentos (c), (oc), (cg) e (ocg).

3.5 DETERMINAÇÃO DA POPULAÇÃO MICROBIANA

A avaliação da população microbiana foi realizada através da estimativa da população de fungos e bactérias heterotróficos, obtida por meio da metodologia no "Número Mais Provável - NMP" segundo WOOPER (1994), CARTER (1993), SCHINNER (1996). As avaliações foram feitas aos 3, 7, 14, 21, 35, 42, 49 e 292 dias de armazenamento.

Em cada uma das datas de avaliação e para os tratamentos (r), (c), (or), e (oc) foram feitas diluições decimais em série até a diluição 10^{-6} . Para compor a diluição inicial foram transferidos 100 mg de solo para tubos de ensaio contendo 10 ml de solução salina (NaCl a 0,85%). Já para os tratamentos (cg) e (ocg), a diluição inicial foi composta transferindo-se 350 μ l da suspensão formada (solo + solução de glicerol), para tubos de ensaio contendo 9,75 ml de solução salina. As diluições iniciais de todos os tratamentos foram agitadas a 100 rpm durante 30 minutos em agitador mecânico de movimentação circular. As diluições posteriores foram obtidas transferindo-se 1 ml da diluição inicial de cada tratamento, para tubos de ensaio contendo 9 ml de solução salina, seguida de vigorosa agitação para homogeneizar a suspensão antes de proceder a diluição seguinte.

No procedimento de inoculação usadas as diluições 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} para fungos e 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} para bactérias. Para realizar as inoculações, após agitação dos tubos contendo as diluições correspondentes, foram transferidas alíquotas de 100 μ l para tubos de ensaio com tampa rosqueável contendo 1000 μ l de meio de cultura de Martin líquido (ANEXOS 1 e 2).

Os procedimentos de tomada e pesagem das alíquotas de solo, diluição decimal em série e inoculação em meio de cultura foram realizados em câmara de segurança microbiológica de fluxo laminar vertical.

Depois de inoculados, os tubos foram fechados e incubados a 25°C durante 7 dias, após o que, procederam-se as leituras de desenvolvimento (positivo), ou não desenvolvimento (negativo), através da avaliação da turvação do meio de cultura. Os

dados das leituras foram compilados, e através da tabela de NMP citada por SCHINNER (1996) (Anexo 3), para uso com diluição decimal e 5 tubos por diluição, foram obtidas os valores das populações de fungos e bactérias. Os valores de leitura em cada diluição, o valor tabelar obtido através das leituras, as correções de diluição e correções em função da umidade do solo encontram-se no Anexo 4.

Todas as análises foram executadas em duplicata e todos os materiais, soluções e meios de cultura utilizados foram previamente autoclavados.

3.5.1 Determinação do fator de confiança e limites de confiança.

O fator de confiança foi obtido através da tabela 1, que por sua vez foi desenvolvida através da equação 5. As estimativas das densidades populacionais de fungos e bactérias foram multiplicadas e divididas por este fator para determinar os limites de confiança máximo e mínimo, respectivamente. Os limites de confiança foram utilizados para identificar diferenças significativas ($p=0,05$) entre dois valores de densidade populacional. Estas populações foram consideradas significativamente diferentes quando o limite mínimo da maior apresentou um valor superior ao limite máximo da menor. Os limites de confiança para cada determinação foram representados em todos os gráficos para facilitar sua interpretação e seus valores numéricos calculados estão no Anexo 5.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Em função da extensão do período de armazenamento observado, a análise do efeitos dos tratamentos foi feita em duas etapas, sendo a primeira de 3 a 49 dias de armazenamento e a segunda em avaliação isolada aos 292 dias. Optou-se por esta forma de análise em função da diferença de comportamento das populações em relação a estes períodos, pois na última determinação os valores das populações mostraram-se maiores que os iniciais. Este comportamento indica que no armazenamento a longo prazo (292 dias) outros fatores podem estar presentes, invalidando uma análise conjunta com períodos iniciais.

Os resultados da avaliação da população de fungos e bactérias em todos os tratamentos e em todas as datas de determinação são mostrados nas tabelas a seguir. Estes resultados foram corrigidos com base em solo seco e em função do volume inoculado. Os valores são apresentados na forma de Unidades Formadoras de Colônia por grama de solo seco.

TABELA 4 VALORES MÉDIOS DA POPULAÇÃO DE FUNGOS NOS TRATAMENTOS ANALISADOS EM TODAS AS DATAS DE DETERMINAÇÃO.

Dias de armazenamento	Tratamentos					
	r	c	cg	or	oc	ocg
	UFC $10^3 \cdot g^{-1}$ de solo					
3	3,51	4,36	3,51	2,66	2,66	3,51
7	2,92	4,36	3,83	1,64	1,64	1,32
14	1,91	2,98	3,51	2,44	1,91	3,67
21	2,98	2,13	3,83	3,83	2,13	5,37
35	4,36	4,36	5,37	7,92	4,36	4,36
42	2,34	4,36	1,81	1,91	2,13	2,44
49	0,78	1,72	1,46	2,98	2,13	0,48
292	5,21	4,20	4,36	5,95	4,20	5,47

TABELA 5 VALORES MÉDIOS DA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS NOS TRATAMENTOS ANALISADOS EM TODAS AS DATAS DE DETERMINAÇÃO.

Dias de armazenamento	Tratamentos					
	r	c	cg	or	oc	ocg
	UFC 10 ⁵ · g ⁻¹ solo					
3	13,29	7,60	10,31	11,16	12,49	7,49
7	1,17	7,23	9,19	3,45	3,35	2,07
14	6,54	3,14	9,51	5,58	9,57	6,59
21	1,91	3,51	5,05	3,19	3,51	8,77
35	3,14	7,44	9,19	8,40	3,51	9,25
42	3,51	7,60	6,32	3,51	8,45	5,05
49	1,91	7,44	2,66	5,10	5,21	5,47
292	1,81	4,36	6,17	1,33	5,05	7,44

Os valores mostrados nas tabelas 4 e 5 são provenientes de tabelas pré-calculadas em função da base de diluição e número de repetições por diluição. Dessa forma, os dados podem assumir apenas determinados valores do conjunto dos números reais, o que é inerente ao método utilizado. Este fato, no entanto, acarreta uma distribuição de frequência fora do padrão normal. Em função desta particularidade, uma análise estatística através da realização de análise de variância para detectar diferenças entre os tratamentos, seguida de teste de médias para identificação das diferenças detectadas, não se aplica neste caso pelo motivo do não cumprimento das premissas exigidas para a realização deste tipo de análise. Mesmo após a transformação logarítmica dos dados, não houve possibilidade de realização de análise de variância padrão, visto que, mesmo dessa forma, os dados não se enquadraram nos pré requisitos exigidos (Anexo 6).

Assim sendo, a linha de tendência dada por regressão linear dos pontos observados nos tratamentos até 49 dias e a equação que a determina foram utilizadas para a comparação entre os tratamentos utilizados. Admitindo-se a regressão linear, a equação resultante é do tipo:

$$y = a + bx \tag{7}$$

Utilizando esta equação, que é a equação geral da reta, para o caso específico deste experimento, pode-se obter a densidade populacional y , no tempo x (em dias),

onde:

a é a densidade populacional inicial;

b é taxa de declínio da densidade populacional

4.2 EFEITO DOS TRATAMENTOS

4.2.1 Análise dos tratamentos até 49 dias de armazenamento.

4.2.1.1 Solo refrigerado

De forma geral, tanto fungos como bactérias apresentaram uma tendência de queda para este tratamento até 49 dias (Gráfico 1). Como já era esperado, a população de fungos mostrou-se inferior à população de bactérias, mantendo a proporção normalmente observada nos solos. A maior população de fungos observada até os 49 dias foi de $4,36 \times 10^3$ UFC g^{-1} de solo, obtida aos 35 dias de armazenamento e a menor foi obtida duas semanas após, aos 49 dias, sendo esta de $7,76 \times 10^2$ UFC g^{-1} de solo. Parte da variação observada nos tratamentos durante o período analisado é inerente ao método de determinação utilizado, e outra parte pode ser devido à distribuição espacial da população microbiana, principalmente em função da superfície de contato com as partículas do solo.

Para os fungos, a diferença observada entre a população aos 3 e aos 49 dias calculada através da equação dada pela regressão foi de $1,20 \times 10^3$ UFC g^{-1} de solo, o que significa uma queda de 37% em relação aos 3 dias de armazenamento. Para bactérias a maior população para este tratamento foi observada aos 3 dias e alcançou um valor de $1,32 \times 10^6$ UFC g^{-1} de solo. A menor foi observada aos 49 dias com $1,91 \times 10^5$ UFC g^{-1} de solo. Os valores de população bacteriana observados aos 7 e 21

GRÁFICO 1 - POPULAÇÃO DE FUNGOS E BACTÉRIAS EM FUNÇÃO DOS DIAS DE ARMAZENAMENTO EM SOLO REFRIGERADO. AS BARRAS DE ERRO INDICAM OS LIMITES DE CONFIANÇA

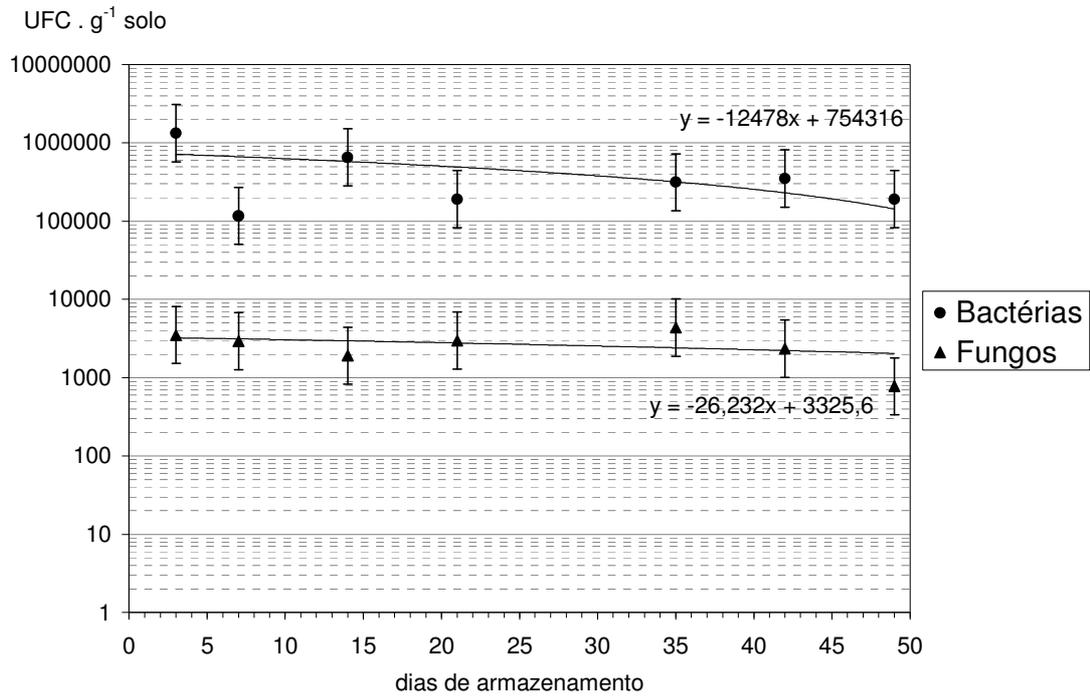
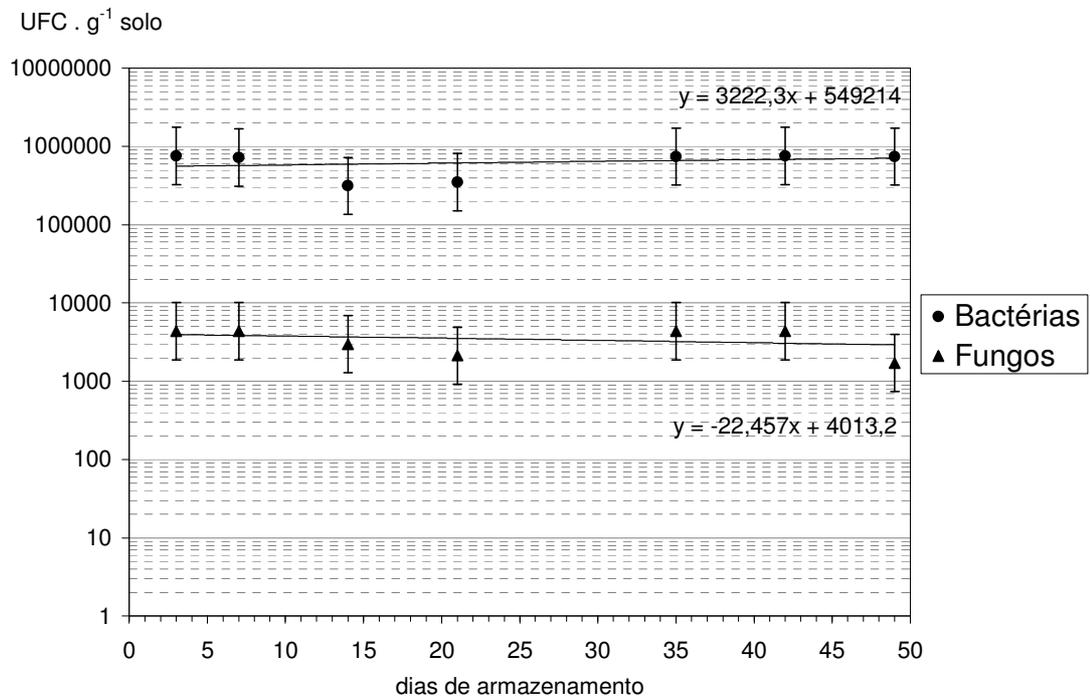


GRÁFICO 2 - POPULAÇÃO DE FUNGOS E BACTÉRIAS EM FUNÇÃO DOS DIAS DE ARMAZENAMENTO EM SOLO CONGELADO. AS BARRAS DE ERRO INDICAM OS LIMITES DE CONFIANÇA



dias para este tratamento não estão de acordo com a dinâmica populacional esperada e provavelmente ocorreram em função de algum erro cometido durante a inoculação. Outra explicação provável pode ser a destruição das formas vegetativas nos primeiros dias e a formação de estruturas de resistência em período maior. Este fato não ocorreria no solo congelado, pois neste caso haveria paralisação do crescimento das formas vegetativas.

Através da diferença entre os valores para 3 e 49 dias calculados pela equação dada pela regressão, obtém-se uma redução de 80% na densidade populacional de bactérias no período, em relação ao calculada para 3 dias.

A discussão da causa da tendência de queda da densidade populacional, observada tanto para fungos quanto para bactérias, será feita mais adiante na comparação entre os tratamentos.

4.2.1.2 Solo congelado

Neste tratamento as populações de fungos e bactérias apresentaram comportamento diferenciado em relação ao solo refrigerado mostrando uma menor variação dos valores observados o que pode ser entendido como uma maior estabilidade ao longo do período analisado (Gráfico 2).

Para fungos o valor máximo, observado no período de 3 a 49 dias de armazenamento foi de $3,51 \times 10^3 \text{ g}^{-1}$ de solo. Este valor repetiu-se nas observações feitas aos 3, 7, 42 e 49 dias de armazenamento, o que já caracterizaria uma maior estabilidade da população de fungos observada neste tratamento. Por outro lado, analisando a equação dada pela regressão e os valores calculados por ela, obtém-se, aos 49 dias, uma redução de 26% em relação ao valor calculado para 3 dias.

Em relação à população bacteriana os valores observados aos 3, 7, 35, 42 e 49 dias foram muito próximos e ficaram dentro do intervalo de $7,22 \times 10^5$ a $7,60 \times 10^5$ UFC g^{-1} de solo, o que também demonstra uma menor variação em relação ao solo

refrigerado. Porém, em função dos valores mais baixos observados aos 14 e 21 dias a linha de tendência mostra um aumento da população de bactérias para este tratamento.

GRÁFICO 3 - POPULAÇÃO DE FUNGOS E BACTÉRIAS EM FUNÇÃO DAS DATAS DE AVALIAÇÃO EM SOLO CONGELADO COM ADIÇÃO DE GLICEROL. AS BARRAS DE ERRO INDICAM OS LIMITES DE CONFIANÇA

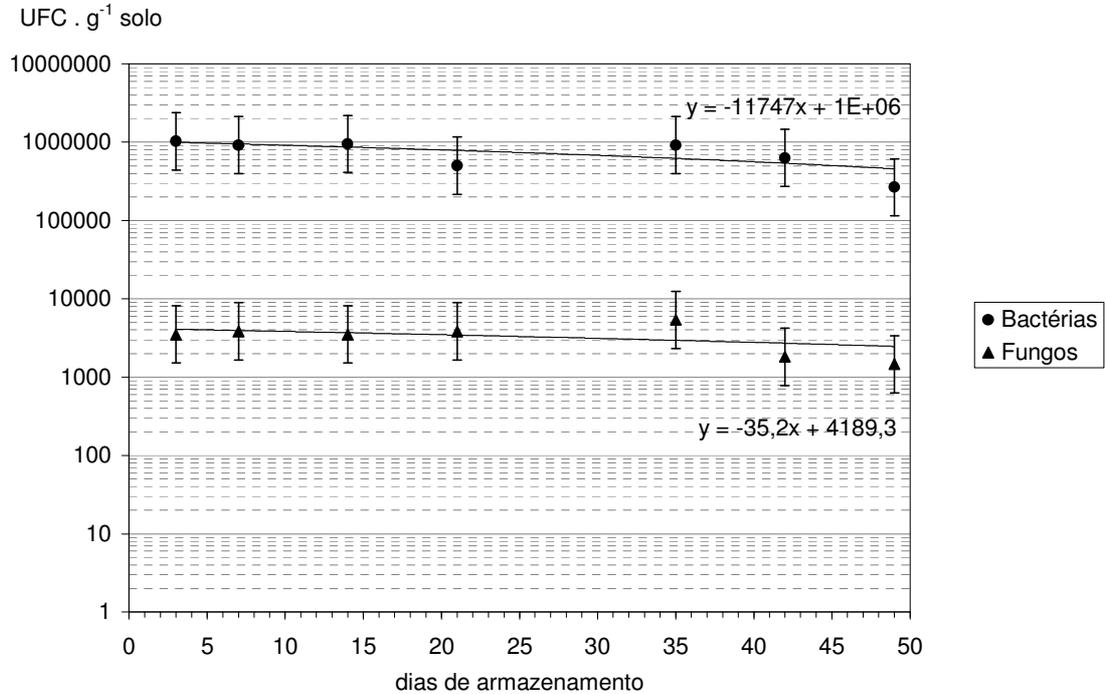
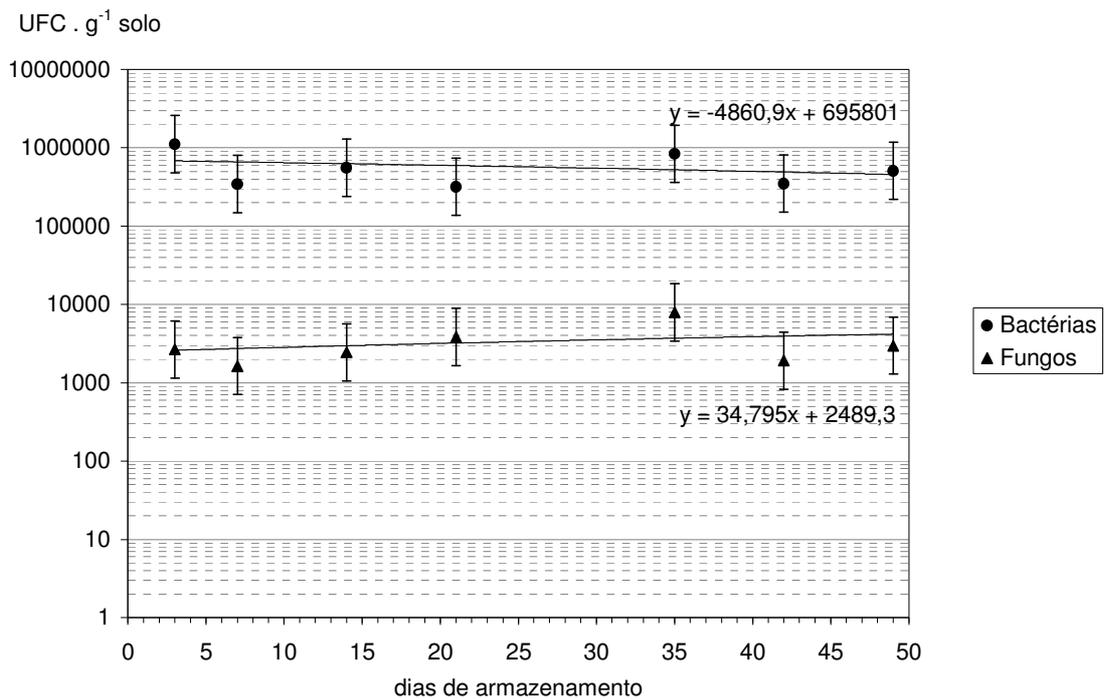


GRÁFICO 4 - POPULAÇÃO DE FUNGOS E BACTÉRIAS EM FUNÇÃO DAS DATAS DE AVALIAÇÃO EM SOLO CONTAMINADO COM ÓLEO E REFRIGERADO. AS BARRAS DE ERRO INDICAM OS LIMITES DE CONFIANÇA



O aumento com base nos valores calculados por esta tendência ficou em 27% em relação ao calculado para 3 dias de armazenamento.

4.2.1.3 Solo congelado com adição de glicerol

Os dados observados para fungos e bactérias demonstraram uma estabilidade inicial seguida de uma queda em ambas as populações (Gráfico 3).

Os valores de densidade populacional observados para fungos aos 3, 7, 14 e 21 dias foram muito próximos e estão entre $3,51 \times 10^3$ a $3,83 \times 10^3$ UFC g^{-1} de solo. O maior e o menor valor observados na população de fungos foram $5,37 \times 10^3$ e $1,46 \times 10^3$ UFC g^{-1} de solo, obtidos aos 35 e 49 dias, respectivamente. A diminuição da população calculada através dos valores dados pela equação, no período de 3 a 49 dias, ficou em 40% em relação 3 dias de armazenamento.

Neste tratamento, os valores de densidade populacional bacteriana também apresentaram uma estabilidade inicial, sendo que aos 3, 7, 14 e 35 dias estes valores apresentaram-se muito próximos. Apesar disso, devido à diminuição nos valores observados aos 21, 42 e 49 dias a tendência geral para o tratamento foi de queda da população de bactérias. A maior e a menor população bacteriana observadas neste tratamento foram de $1,03 \times 10^6$ e $2,66 \times 10^5$ UFC g^{-1} de solo, aos 3 e 49 dias de armazenamento, respectivamente. O valor de redução da população aos 49 dias, calculado a partir da equação fornecida, foi maior do que nos fungos e ficou em 56% em relação ao valor de população calculado para 3 dia de armazenamento.

4.2.1.4 Solo contaminado com petróleo e refrigerado.

Para este tratamento a variação da população de fungos e de bactérias um pouco maior do que para o tratamento com glicerol (Gráfico 4). De uma forma geral, o comportamento da população de fungos mostrou uma tendência de aumento ao longo

dos 49 dias analisados, enquanto que para as bactérias a tendência foi de queda da população observada.

A população de fungos observada aos 3 dias de armazenamento foi de $2,66 \times 10^3$ UFC g^{-1} de solo, ao passo que aos 49 dias o valor obtido foi de $2,98 \times 10^3$ UFC g^{-1} de solo. O maior valor observado foi aos 35 dias de armazenamento com $7,92 \times 10^3$ UFC g^{-1} de solo e o menor valor, que ocorreu aos 7 dias, foi de $1,92 \times 10^3$ UFC g^{-1} de solo. Através do cálculo utilizando a equação fornecida pela regressão, obtém-se uma diferença entre a população final e inicial de $1,6 \times 10^3$ UFC g^{-1} de solo, o que representa 62% de aumento da população de fungos no período de 3 a 49 dias de armazenamento.

O comportamento da população de bactérias neste tratamento, diferentemente do observado para os fungos, apresentou uma tendência de queda ao longo do período observado. O valor de $1,12 \times 10^6$ UFC g^{-1} de solo foi o maior valor da série e foi observado aos 3 dias de armazenamento. Desta data em diante, apesar de ter ocorrido alguma variação com flutuação dos valores observados posteriormente, a tendência foi de diminuição da população ao longo do período. O menor valor observado para a população de bactérias neste tratamento foi obtido aos 21 dias de armazenamento com $3,19 \times 10^5$ UFC g^{-1} de solo. O valor calculado pela equação para 3 e 49 dias foi de $6,81 \times 10^5$ e $4,58 \times 10^5$ UFC g^{-1} de solo, respectivamente, o que evidencia uma queda na população de bactérias na ordem de 33%, em relação ao valor calculado para 3 dias de armazenamento.

GRÁFICO 5 - POPULAÇÃO DE FUNGOS E BACTÉRIAS EM FUNÇÃO DAS DATAS DE AVALIAÇÃO EM SOLO CONTAMINADO COM ÓLEO E CONGELADO. AS BARRAS DE ERRO INDICAM OS LIMITES DE CONFIANÇA

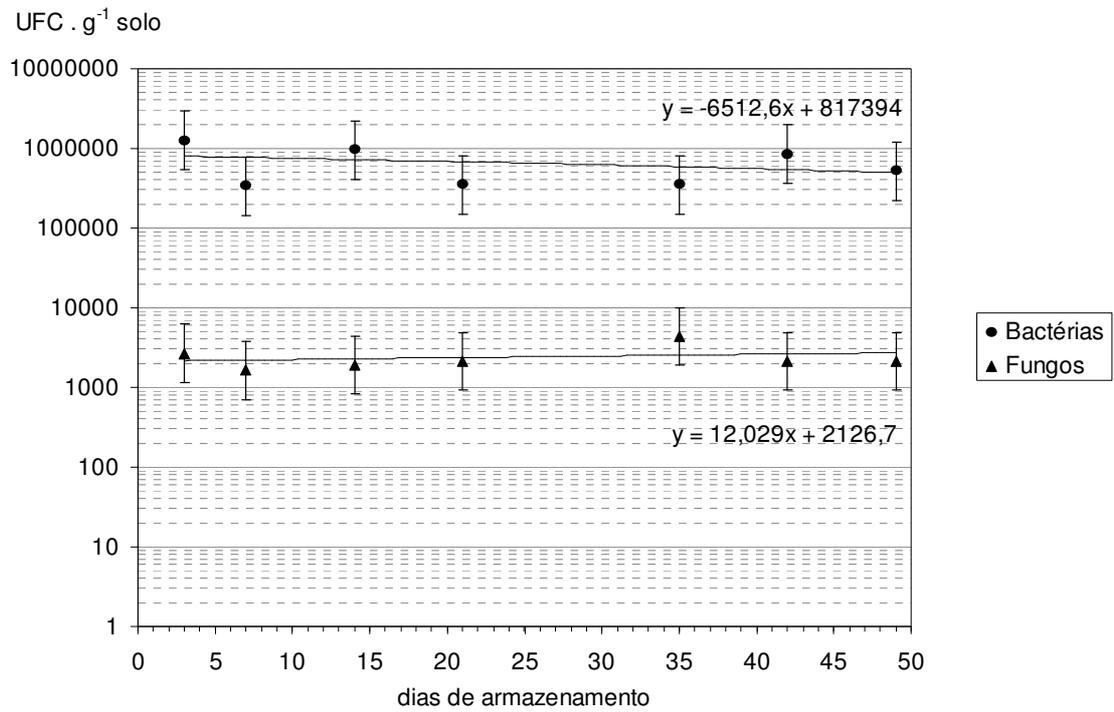
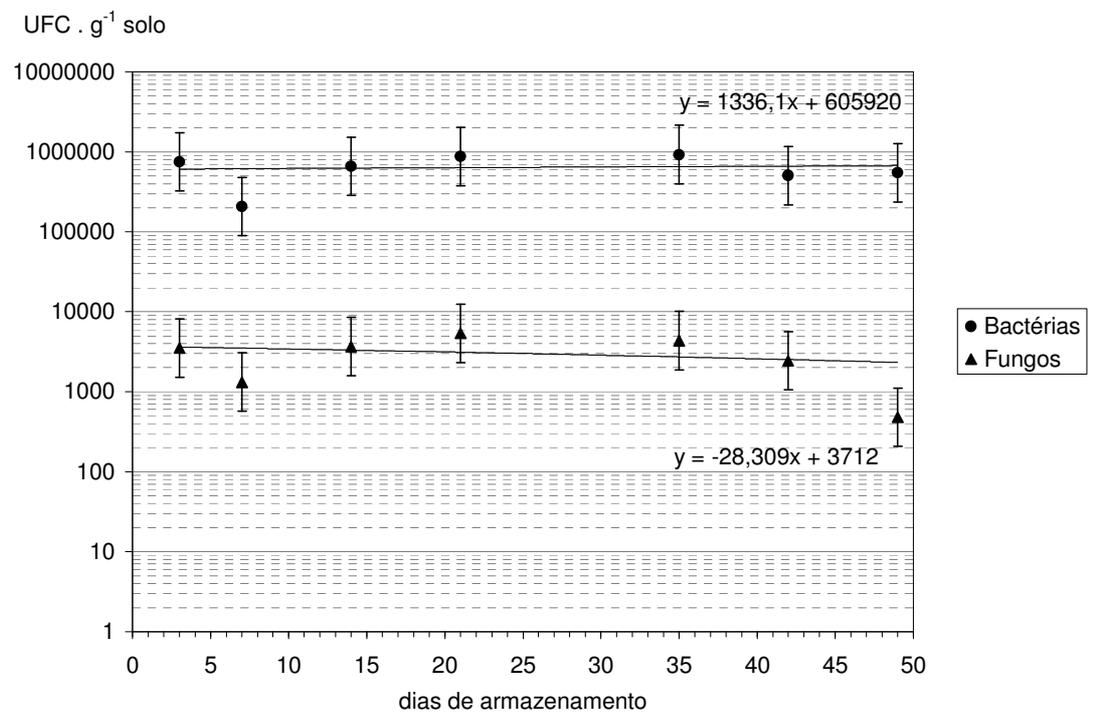


GRÁFICO 6 - POPULAÇÃO DE FUNGOS E BACTÉRIAS EM FUNÇÃO DAS DATAS DE AVALIAÇÃO EM SOLO CONTAMINADO COM ÓLEO E CONGELADO COM ADIÇÃO DE GLICEROL. AS BARRAS DE ERRO INDICAM OS LIMITES DE CONFIANÇA



4.2.1.5 Solo contaminado com petróleo e congelado

De uma forma geral, as tendências de aumento da população de fungos e queda da população de bactérias permaneceram próximas ao observado no tratamento anterior, apenas com o diferencial de uma taxa de aumento da população de fungos mais branda do que para o solo refrigerado (Gráfico 5).

Apesar da população de fungos ter apresentado o mesmo valor de $2,13 \times 10^3$ UFC g^{-1} de solo para 21, 42 e 49 dias de armazenamento, os valores mais baixos observados aos 7 e 14 dias e principalmente o valor mais alto aos 35 dias, fizeram deslocar a linha de tendência obtida, indicando um aumento desta população. Este aumento, calculado pela equação dada, foi estimado em 26% em relação ao valor calculado para 3 dias de armazenamento. Esta taxa corresponde a menos da metade da obtida para a população de fungos do tratamento anterior.

Para a população de bactérias, apesar da variação populacional obtida nas primeiras observações, a tendência desta população para este tratamento foi de declínio ao longo do período. Assim como ocorreu na maioria dos tratamentos a observação feita aos 3 dias de armazenamento foi a que mostrou o maior valor em relação às outras datas de avaliação, e para este tratamento foi de $1,25 \times 10^6$ UFC g^{-1} de solo. A queda de população, calculada através dos valores da linha de tendência dada por regressão linear, em função dos valores calculados para 3 e 49 dias de armazenamento, ficou em 38%.

4.2.1.6 Solo contaminado com petróleo e congelado com adição de glicerol.

A adição de glicerol neste tratamento parece ter mostrado efeito estabilizador apenas sobre a população de bactérias, já que para fungos, acarretou uma tendência de queda na população (Gráfico 6). Além disso, o glicerol parece ter influenciado na determinação das populações causando uma maior variação entre as datas de análise, quando comparado com o tratamento com solo contaminado e congelado.

O valor mais alto observado na população de fungos para este tratamento foi $5,37 \times 10^3$ UFC g^{-1} de solo, obtido aos 21 dias de armazenamento. O valor de $4,78 \times 10^2$ UFC g^{-1} , observado aos 49 dias, não só foi o mais baixo deste tratamento, mas também foi o valor mais baixo observado na população de fungos de todos os tratamentos em todas as datas de avaliação. Este fato talvez possa ser explicado pelo efeito de variação causado pela adição do glicerol neste tratamento. A queda calculada para a população de fungos neste tratamento foi de 36% em relação ao valor calculado para 3 dias de armazenamento. É interessante lembrar que no tratamento com solo contaminado e congelado o comportamento calculado foi de aumento em torno de 26%, para as mesmas circunstâncias.

Para bactérias, os valores observados mostraram uma estabilidade bem maior do que a observada para a população de fungos. Embora tenha sido observado um valor aos 7 dias visivelmente mais baixo do que os demais, a tendência geral foi de um tratamento que produziu resultados com menos variações entre as datas de determinação. Considerando os valores calculados através da equação, este tratamento apresentou uma aumento de população aos 49 dias de armazenamento de apenas 10%.

4.2.2 Análise dos tratamentos aos 292 dias de armazenamento.

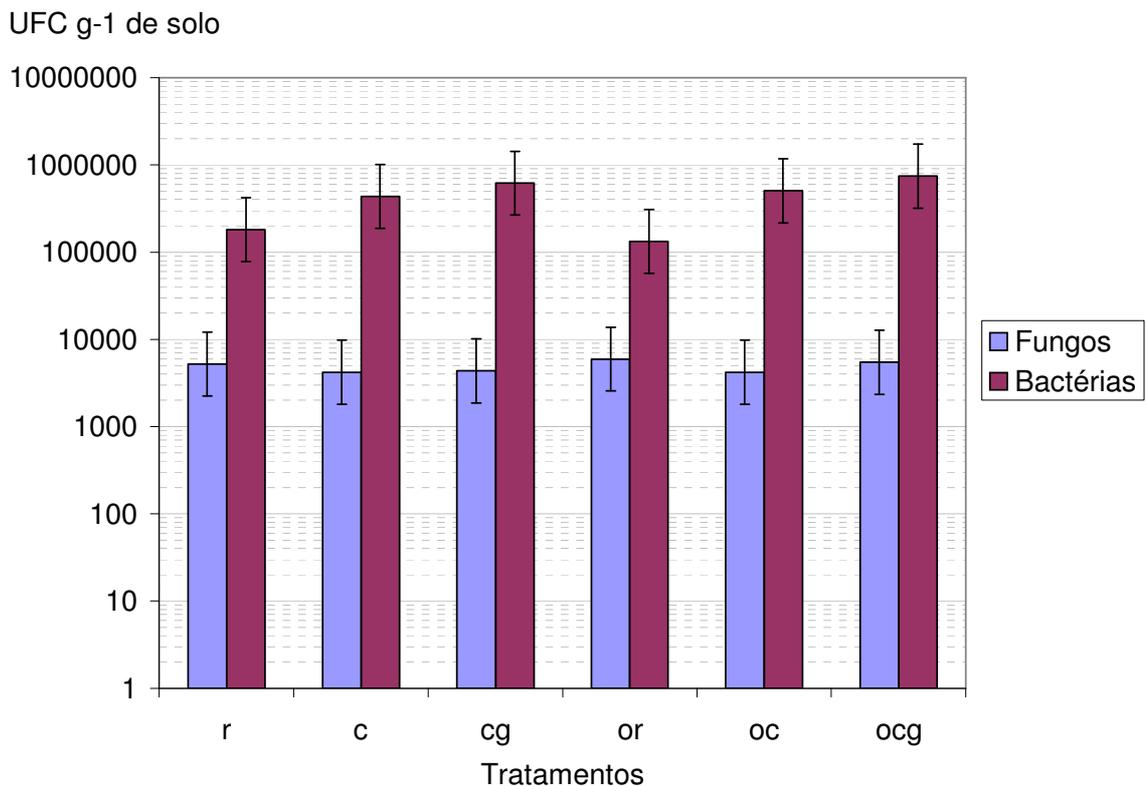
Os dados de população de fungos e de bactérias observados aos 292 dias de armazenamento mostraram valores bem diferentes da tendência obtida até os 49 dias. (Gráfico 7).

A diferença observada em comparação com o período inicial de armazenamento pode ser explicada em função do intervalo de 243 dias decorrido desde a última observação realizada.

Os limites de confiança para a estimativa de cada população foram utilizados para detectar diferenças entre os tratamentos. Para esta data, apesar de não ter sido encontrada diferença significativa entre os tratamentos, a população de bactérias nos diferentes tratamentos mostrou um gradiente que merece ser levado em consideração.

A análise dos dados da população de bactérias para esta data, indicam que mesmo em um longo prazo de armazenamento, o que devido à deformação em relação aos dados iniciais não seria recomendado, os tratamentos com solo sob refrigeração mostraram-se menores do que os tratamentos com solo sob congelamento e congelamento com adição de glicerol.

GRÁFICO 7 - POPULAÇÃO DE FUNGOS E BACTÉRIAS AOS 292 DIAS DE ARMAZENAMENTO EM TODOS OS TRATAMENTOS. AS BARRAS DE ERRO INDICAM OS LIMITES DE CONFIANÇA



4.3 COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS

Para a comparação entre os tratamentos, foram utilizados os modelos matemáticos obtidos através da regressão linear nos dados observados de 3 a 49 dias de armazenamento, em cada um dos tratamentos. Este processo foi utilizado para estabelecer o tratamento que obteve o melhor grau de estabilidade em relação à população inicial.

Para melhor visualização das diferenças entre os tratamentos, a comparação foi feita separadamente para as populações de fungos e de bactérias.

4.3.1 Efeito dos tratamentos sobre a população de fungos

4.3.1.1 Em solo não contaminado

Dentre os tratamentos sem óleo, o tratamento refrigerado (r) mostrou, já aos 3 dias de armazenamento, uma população menor do que o observado para o tratamento congelado (c) e congelado com adição de glicerol (cg) (Gráfico 8).

Através da análise do coeficiente angular dado pela equação situada na legenda do gráfico 8, foi possível estimar a taxa de decaimento diária da população nos tratamentos sem óleo. A maior taxa de decaimento no período foi obtida no tratamento (cg), mostrando que este foi o pior tratamento em termos de estabilidade em relação à população inicial. O tratamento que se mostrou mais estável para a população de fungos em solo sem óleo foi o congelamento.

4.3.1.2 Em solo contaminado.

A população de fungos para estes tratamentos foi relativamente menor do que para aqueles com solo sem contaminação (Gráfico 9).

A análise do efeito dos tratamentos sobre a população inicial de fungos e também de bactérias deve também levar em conta a mortalidade dos microrganismos provocada pela mistura do óleo na amostra. Se for considerado que morte dos microrganismos ocorre no momento da mistura (dia 0), os valores iniciais observados no gráfico refletem o efeito dos tratamentos sobre uma população inicialmente menor.

GRÁFICO 8 - POPULAÇÃO DE FUNGOS EM SOLO NÃO CONTAMINADO SOB REFRIGERAÇÃO, CONGELAMENTO E CONGELAMENTO COM ADIÇÃO DE GLICEROL, OBTIDA ATRAVÉS DA EQUAÇÃO DADA PELA REGRESSÃO DOS PONTOS OBSERVADOS.

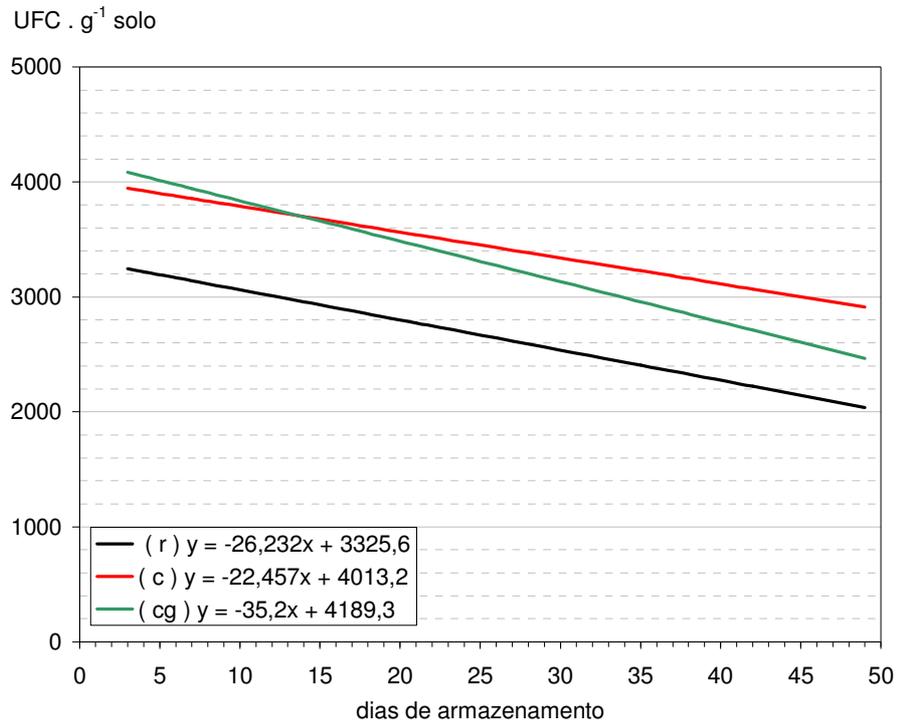
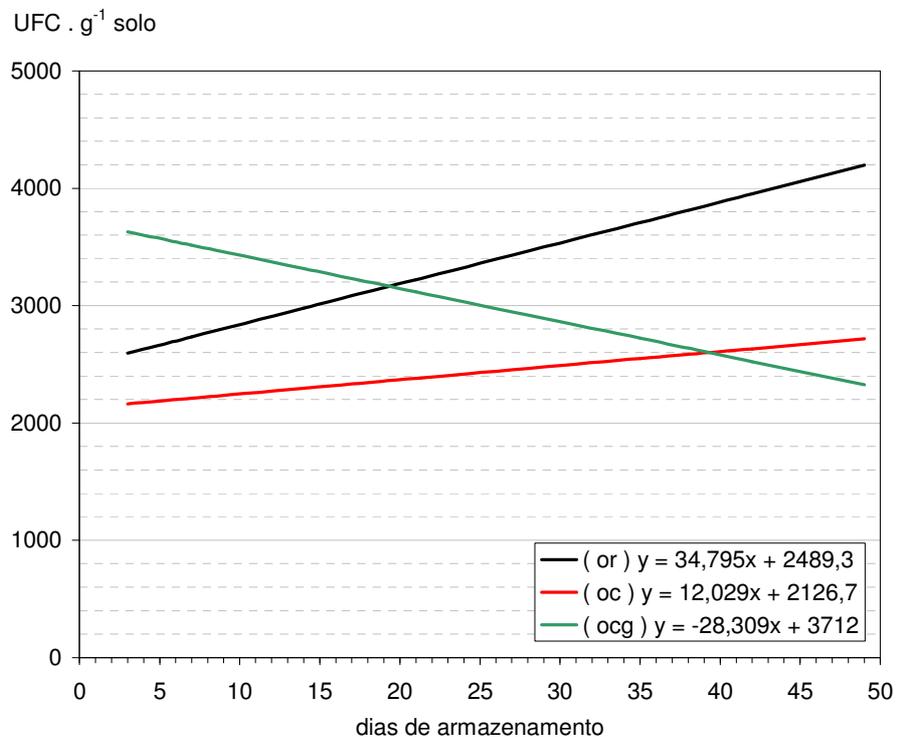


GRÁFICO 9 - POPULAÇÃO DE FUNGOS EM SOLO CONTAMINADO SOB REFRIGERAÇÃO, CONGELAMENTO E CONGELAMENTO COM ADIÇÃO DE GLICEROL, OBTIDA ATRAVÉS DA EQUAÇÃO DADA PELA REGRESSÃO DOS PONTOS OBSERVADOS.



Aos 3 dias de armazenamento, a maior população de fungos para estes tratamentos, foi obtida no solo congelado com adição de glicerol. Em uma análise superficial, este efeito poderia ser atribuído à sua capacidade de estabilização de membranas quando do congelamento. Porém, quando comparados aos tratamentos sem óleo e admitindo-se uma mortalidade equivalente para as amostras contaminadas, nota-se que a adição de glicerol após a contaminação interferiu de alguma forma na metodologia utilizada.

Assim como para o solo não contaminado, o tratamento que se mostrou mais estável foi o congelamento, que apresentou um pequeno acréscimo ao longo do período.

O tratamento refrigerado apresentou um aumento expressivo da população que ficou em torno de $34,79 \text{ UFC g}^{-1}$ de solo por dia. Este aumento pode ser em decorrência da decomposição do óleo realizada pelos fungos, já que a temperatura de refrigeração, que é mais alta do que a do congelamento, pode ter permitido esta maior atividade metabólica.

4.3.2 Efeito dos tratamentos sobre a população de bactérias

4.3.2.1 Em solo não contaminado

Igualmente ao ocorrido para fungos em solo não contaminado, o tratamento (cg) apresentou o maior valor inicial de população, seguido do tratamento (r) e do tratamento (c). Este resultado indica que em solo não contaminado a adição de glicerol, pelo menos inicialmente, causou o efeito esperado. Porém, no decorrer do armazenamento a tendência observado foi de queda da população.

Inicialmente o tratamento (r) apresentou um valor intermediário aos outros, entretanto, também provocou um decaimento da população de $1,25 \times 10^3 \text{ UFC g}^{-1}$ de solo ao dia, o que ficou próximo da taxa obtida no tratamento (cg).

GRÁFICO 10 POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS EM SOLO NÃO CONTAMINADO SOB REFRIGERAÇÃO, CONGELAMENTO E CONGELAMENTO COM ADIÇÃO DE GLICEROL, OBTIDO ATRAVÉS DA EQUAÇÃO DADA PELA REGRESSÃO DOS PONTOS OBSERVADOS.

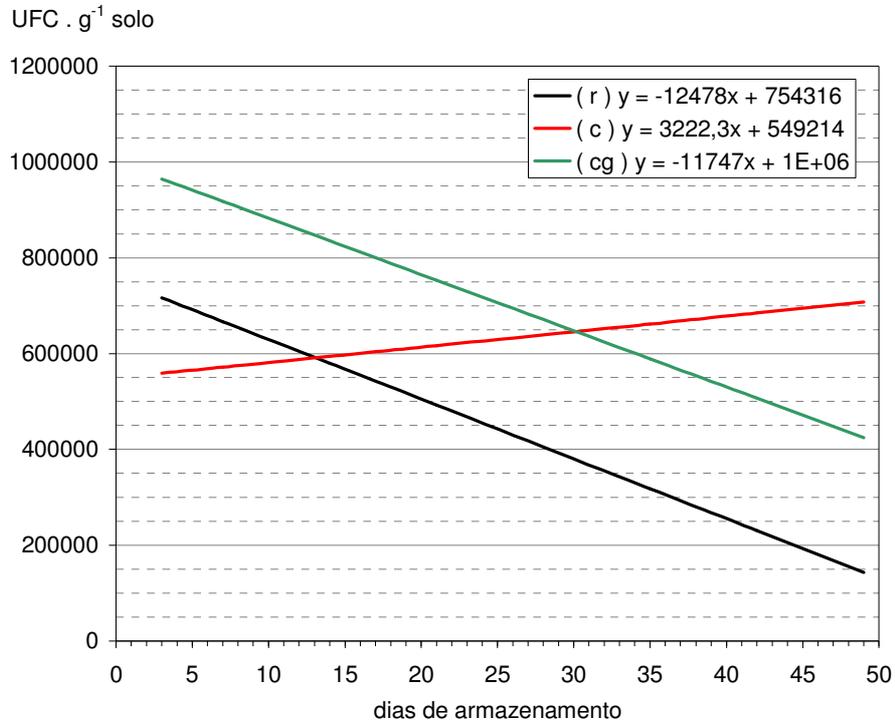
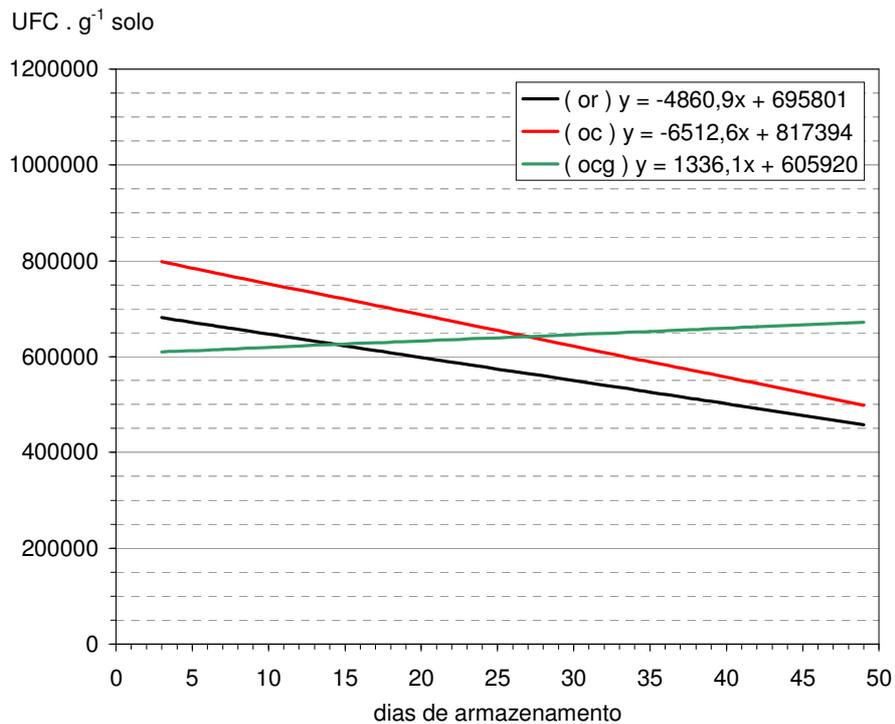


GRÁFICO 11 - POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS EM SOLO CONTAMINADO SOB REFRIGERAÇÃO, CONGELAMENTO E CONGELAMENTO COM ADIÇÃO DE GLICEROL, OBTIDO ATRAVÉS DA EQUAÇÃO DADA PELA REGRESSÃO DOS PONTOS OBSERVADOS.



Novamente, seguindo a mesma tendência dos casos anteriores o congelamento foi o tratamento em que ocorreu menor alteração em relação à população inicial.

4.3.1.2 Em solo contaminado

A amplitude das diferenças entre os tratamentos para este solo foi menor do que para o solo não contaminado. A média dos valores iniciais de população bacteriana também foi mais baixa, provavelmente em função do efeito do óleo sobre a população inicial no momento da mistura. O tratamento que apresentou o maior valor inicial foi o congelamento, seguido pela refrigeração e o congelamento com adição de glicerol. O tratamento (cg), embora tenha apresentado o menor valor inicial, foi o tratamento mais estável, apresentando apenas uma pequena taxa de aumento da população ao longo do tempo analisado.

De certa forma, a tendência observada até o momento, indica o congelamento como a melhor forma de armazenamento de amostras para os parâmetros em questão. Mesmo para o solo contaminado discutido neste item, no qual o tratamento (cg) se mostrou mais estável, a diferença deste para os demais foi bem menos intensa do que, por exemplo, as obtidas entre os tratamentos quando aplicados ao solo não contaminado.

Portanto, de acordo com o comportamento geral até o momento, o congelamento parece ser a melhor opção de armazenamento tanto para fungos como para bactérias o que estaria de acordo com o observado por SHISHIDO e CHANWAY (1998) e por STENBERG et al. (1998).

No entanto, a utilização do glicerol e a contaminação artificial com óleo feita no laboratório parece ter influenciado os resultados obtidos. Em virtude deste fato, nos itens a seguir realizou-se um isolamento destes efeitos.

4.4 EFEITO DO ÓLEO NOS TRATAMENTOS.

Para estimar o efeito do óleo e do glicerol foram utilizados os valores calculados pela equação dada pela regressão linear dos pontos observados de 3 a 49 dias de armazenamento. Portanto, para determinar o efeito causado pela contaminação do óleo ao longo do tempo nos tratamentos foram utilizadas as percentagens dos valores referentes aos tratamentos com óleo em relação àqueles sem óleo, para o período citado.

4.4.1 Sobre a população de fungos

Os dados mostrados no gráfico 12 indicam claramente um efeito positivo do óleo sobre a população de fungos no solo mantido sob refrigeração. Este fato pode ser explicado por um provável aproveitamento do óleo como fonte de carbono pela população de fungos existente na amostra armazenada. Este efeito no solo contaminado sob refrigeração foi extremamente acentuado, sendo que a população de fungos para este tratamento aos 49 dias de armazenamento foi 105 % maior do que a observada no solo sem óleo. O mesmo efeito também foi identificado no congelamento, porém, a velocidade de aumento da população de fungos foi menor. Praticamente não houve efeito do óleo sobre o tratamento (cg).

4.4.2 Sobre a população de bactérias

Para bactérias (Gráfico 13) o efeito do óleo no solo refrigerado foi ainda mais acentuado que para os fungos, sendo que aos 49 dias a população de bactérias no tratamento (or) foi 220 % maior do que a população bacteriana para (r). Para o tratamento (ocg), ocorreu o mesmo fenômeno de maneira mais branda. Já para (oc) a presença do óleo parece ter contribuído para a diminuição da população de bactérias ao longo do tempo.

GRÁFICO 12 PERCENTAGEM DA POPULAÇÃO DE FUNGOS NOS TRATAMENTOS COM ÓLEO EM RELAÇÃO AOS MESMOS TRATAMENTOS SEM ÓLEO, EM FUNÇÃO DOS DIAS DE ARMAZENAMENTO.

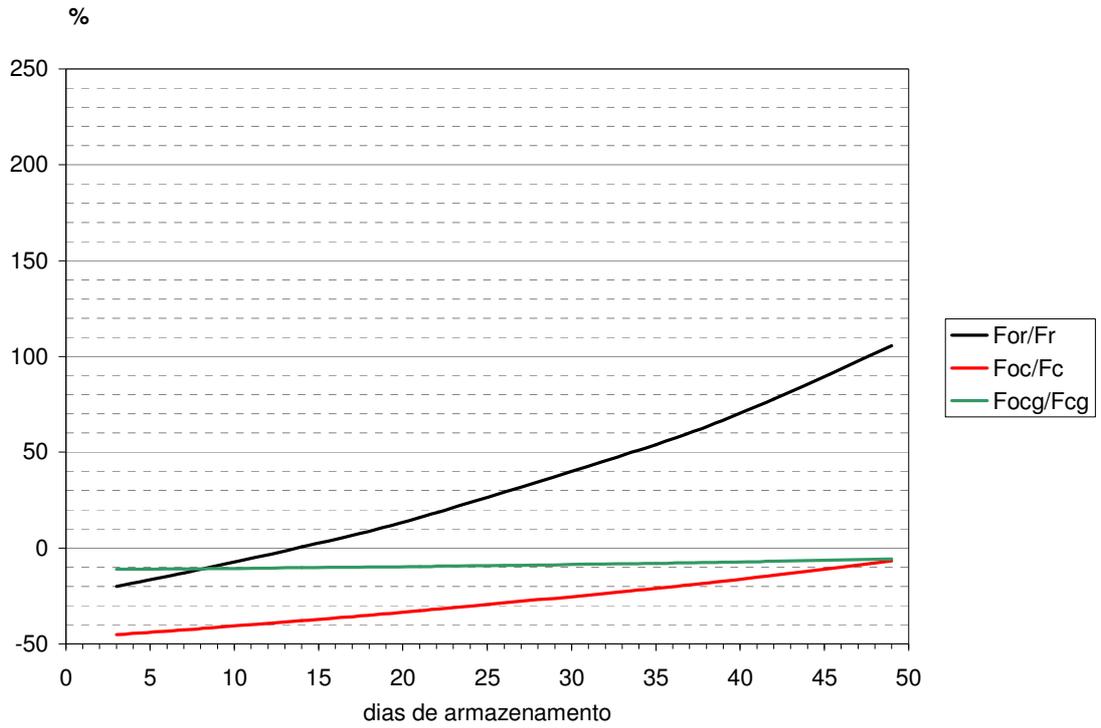
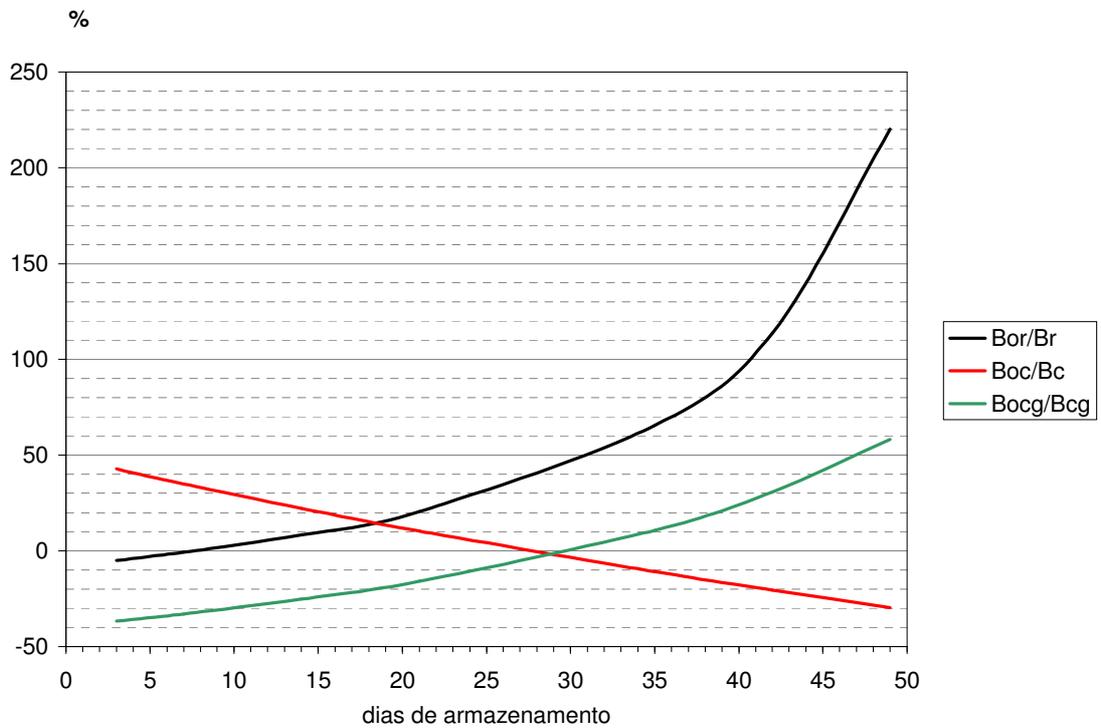


GRÁFICO 13 - PERCENTAGEM DA POPULAÇÃO DE FUNGOS NOS TRATAMENTOS COM ÓLEO EM RELAÇÃO AOS MESMOS TRATAMENTOS SEM ÓLEO, EM FUNÇÃO DOS DIAS DE ARMAZENAMENTO.



4.5 EFEITO DO GLICEROL NOS TRATAMENTOS.

4.5.1 Efeito sobre a população de fungos

O glicerol parece ter exercido um efeito diferenciado sobre a população de fungos nos solos com e sem óleo. Para o solo sem óleo os resultados mostrados no gráfico 14 mostram que o uso glicerol não interferiu na população inicial quando comparado ao mesmo tratamento sem o uso de glicerol. Porém aos 50 dias o tratamento (cg) apresentou uma redução de 15,4 % em relação ao tratamento (c).

Entretanto, para o solo com óleo observou-se um efeito mais expressivo da adição do glicerol (ocg), o que é evidenciado por um aumento de 67 % em relação ao tratamento (oc), obtido aos 3 dias de armazenamento. Este efeito não foi homogêneo ao longo do tempo sendo que aos 49 dias o tratamento (ocg) apresentou um valor 14,4% inferior ao tratamento (oc).

Este resultado indica que a adição do glicerol ou algum outro fator relacionado à sua utilização influenciou negativamente a população de fungos ao longo do período observado.

4.5.2 Efeito sobre a população de bactérias.

Da mesma forma que ocorreu para a população de fungos, a adição do glicerol apresentou efeito diferenciado sobre a população de bactérias observada em solo com e sem óleo (Gráfico 15).

No solo sem óleo a adição de glicerol parece ter mostrado o efeito de estabilização esperado com valores de população 72,6% superior ao tratamento (c), porém da mesma forma como ocorreu para os fungos este efeito foi reduzido ao longo do tempo, sendo que aos 49 dias, a população de bactérias para o tratamento (cg) foi 40% inferior em relação ao tratamento (c). Para o solo com óleo ocorreu o inverso, comportamento este, diferente do observado para a população de fungos.

GRÁFICO 14 - PERCENTAGEM DA POPULAÇÃO DE FUNGOS NOS TRATAMENTOS COM GLICEROL EM RELAÇÃO AOS MESMOS TRATAMENTOS SEM GLICEROL, EM FUNÇÃO DOS DIAS DE ARMAZENAMENTO.

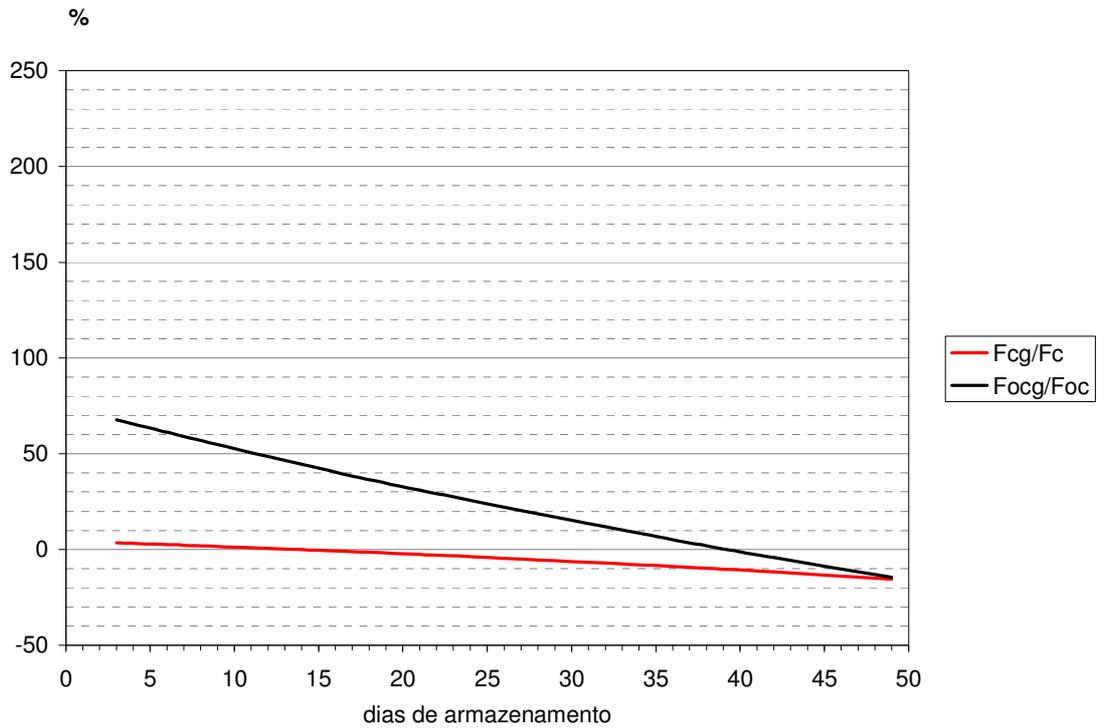
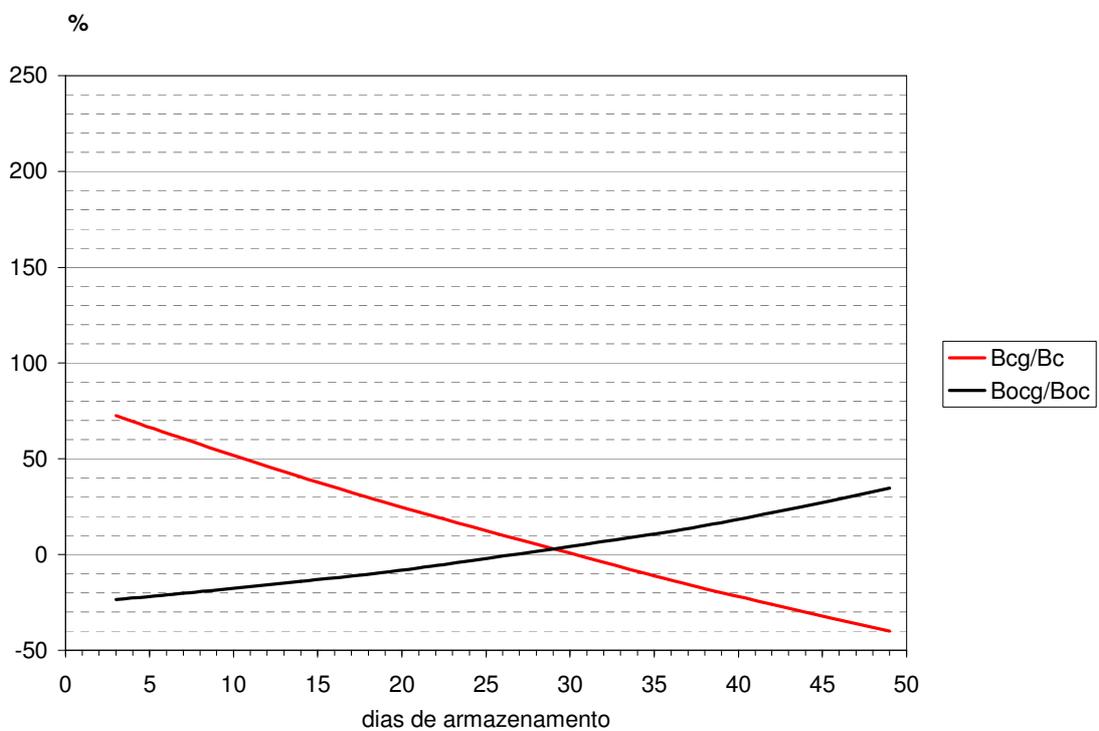


GRÁFICO 15 PERCENTAGEM DA POPULAÇÃO DE FUNGOS NOS TRATAMENTOS COM GLICEROL EM RELAÇÃO AOS MESMOS TRATAMENTOS SEM GLICEROL, EM FUNÇÃO DOS DIAS DE ARMAZENAMENTO.



5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos e nas condições em que foi realizado o experimento pode-se concluir que:

1. Entre as opções testadas, A melhor forma de armazenamento para solos com ou sem contaminação com petróleo foi o congelamento.

2. A refrigeração não deve ser recomendada como forma de armazenamento de solo contaminado com petróleo.

3. O óleo presente nos tratamentos com solo contaminado parece ter sido utilizado como fonte de carbono, por fungos e bactérias durante o período de armazenamento.

4. A adição do glicerol ou algum outro fator relacionado à sua utilização influenciou negativamente a população de fungos ao longo do período observado.

5. Novas pesquisas envolvendo o estudo da respiração e biomassa microbiana, assim como sua atividade enzimática seriam interessantes para melhor elucidar o efeito do óleo e do uso do glicerol, nestas condições.

6 REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, M. **Introducción a la microbiología del suelo**. México: Libros Y Editoriales, 1980.
- ALEXANDER, M. Most probable number method for microbial populations. In: PAGE, A.L. et al. **Methods of soil analysis**. Part 2. 2.ed. Madison: American Society of Agronomy, 1982. p. 815-820.
- ANDERSON, J. P. E.; DOMSCH, K. H. Quantities of plant nutrients in the microbial biomass of selected soils. **Soil Science**, Baltimore, 130:211-216, 1980.
- ANDERSON, J. P. E.; DOMSCH, K. H. **Soil Biol. Biochem.**, v. 10, p. 207, 1978.
- ANDERSON, J. P. E. Handling and storage of soils for pesticide experiments. In: SOMERVILLE, L.; GREAVES, M. P. **Pesticides effects on soil microflora**. London: Taylor and Francis, 1987, p. 45-60.
- ANDRADE, D. S.; HAMAKAWA, P. J. Estimativa do número de células viáveis de rizóbio no solo e em inoculantes por infecção em plantas. In: HUNGRIA, E.M.; ARAÚJO, R.S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA, 1994. p. 63-94.
- ARAÚJO; R. S.; HUNGRIA, M. **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: EMBRAPA-CNPAP, 1994.
- BIEDERBECK, V. O.; CAMPBELL, C. A. Influence of simulated fall and spring conditions on the soil system. I. Effect on soil microflora. **Soil Sci. Soc. Amer. Proc.**, v. 35, p. 474-479, 1971.
- BRANDÃO, E. M. Os componentes da comunidade microbiana do solo. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 1-15.
- CARTER, M. R. **Soil sampling and methods of analysis**. Boca Raton: Corporate Blvd, 1993. p. 268-275.
- COCHRAN, W. G. Estimation of bacterial densities by means of the "most probable number." **Biometrics**, v. 6, p. 105-116, 1950.
- EDWARDS, A. C.; CRESSER, M. S. Freezing and its effect on chemical and biological properties of soil. **Advances in Soil Science**, v. 18, p. 59-79, 1992.
- GRAY, T. R. G.; WILLIAMS, S. T. **Soil microorganisms**. 2ª ed. London: Longman, 1975.
- HART, S. C. et al. Nitrogen mineralization, immobilization and nitrification. In: WEAVER, R. W. et al. **Methods of Soil Analysis**, Part 2, Microbial and Biochemical Properties. Madison: SSSA, 1994. p. 985-1018.
- JENKINSON, D. S.; POWLSON, D. S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil - I. Fumigation with chloroform. **Soil Biol. Biochem.**, Oxford, v. 8, p. 167-177, 1976.

- LADD, J. N.; OADES, J. M.; AMATO, M. Microbial biomass formed from ^{14}C , ^{15}N labelled plant material decomposing in soils in the field. **Soil Biol. Biochem.**, Oxford, v. 13, p. 119-126, 1981.
- LEHRSCHE, G. A.; SOJKA, R. E.; CARTER, D. L.; JOLLEY, P. M. Freezing effects on aggregate stability affected by texture, mineralogy, and organic matter. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v. 55, p. 1401-1406, 1991.
- LOYER, M. W.; HAMILTON, M. A. Interval estimation of the density of organisms using a series experiment. **Biometrics**, v.40, p. 907-916, 1987.
- MAACK, R. **Geografia física do estado do Paraná**. Curitiba: José Olympio, 1981.
- MACK, A. R. Low-temperature research on nitrate release from soil. **Nature**, London, v. 193, p. 803-804, 1962.
- MacLEOD, R. A.; CALCOTT, P. H. Cold shock and freezing damage to microbes. In: GRAY, T.R.G.; POSTGATE, J. R. **The survival of vegetative microbes**. Cambridge: Cambridge University Press, 1976. p. 81-109.
- NANNIPIERI, P.; JOHNSON, R. L.; PAUL, E. A. Criteria for measurement of microbial growth and activity in soil. **Soil Biol. Biochem.**, Oxford, v.10, p.223-229, 1978.
- PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw-Hill, 1980.
- PETERSEN, S. O.; KLUG, M. J. Effects of sieving, storage, and incubation temperature on the phospholipid fatty acid profile of a soil microbial community. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 7, p. 2421-2430, 1994.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. *Biologia Vegetal*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 11-12, 1996.
- RIDOUT, M. S. A comparison of confidence interval methods for dilution series experiments. **Biometrics**, v. 50, p. 289-286, 1994.
- ROSS, D. J. et al. Influence of storage on soil microbial biomass estimated by three biochemical procedures. **Soil Biol. Biochem.**, Oxford, v. 12, p. 369-374, 1980.
- ROSS, D. J. Microbial biomass in a storage soil: A comparison of different estimation procedures. **Soil Biol. Biochem.**, Oxford, v. 23, n. 10, p. 1005-1007, 1991.
- SCHINNER, F. **Methods in soil biology**. New York: Springer-Verlag, 1996.
- SHISHIDO, M.; CHANWAY, C. P. Storage effects on indigenous soil microbial communities and PGPR efficacy. **Soil Biol. Biochem.**, Oxford, v.30, n. 7, p. 939-937, 1998.
- SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; GRISI, B.; HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. **Microorganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental**. Brasília: EMBRAPA, 1994.
- SKOGLAND, T.; LOMELAND, S.; GOKSØYR, J. Respiratory burst after freezing and thawing of soil: experiments with soil bacteria. **Soil Biol. Biochem.**, Oxford, v.20, n. 6, p. 851-856, 1988.

SOULIDES, D. A.; ALLISON, F. E. Effect of drying and freezing soils on carbon dioxide production, available mineral nutrients, aggregation, and bacterial population. **Soil Sci.**, v. 91, p. 291-298, 1961.

STENBERG, B.; JOHANSSON, M.; PELL, M.; SJÖDAHL-SVENSSON, K.; STENSTRÖM, J.; TORSTENSSON, L. Microbial biomass and activities in soil as affected by frozen and cold storage. **Soil Biol. Biochem.**, Oxford, v. 30, n. 3, p. 393-402, 1998.

STOTZKI, G. Soil as an Environment for Microbial Life. In: ELSAS, J. D. van; TREVORS, J. T.; WELLINGTON, E. M. H. **Modern soil microbiology**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1997. p. 1-19.

THORN G. The fungi in soil. In: ELSAS, J. D. van; TREVORS, J. T.; WELLINGTON, E. M. H. **Modern soil microbiology**. New York: Marcel Dekker, 1997. p. 63-127.

VERCHOT, L. V. Cold storage of a tropical soil decreases nitrification nitrification potential. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v. 63, p. 1942-1944, 1999.

WELLINGTON, E. M. H. et al. Indirect Approaches for Studying Soil Microorganisms Based on Cell Extraction and Culturing. In: ELSAS, J. D. van; TREVORS, J. T.; WELLINGTON, E. M. H. **Modern soil microbiology**. New York: Marcel Dekker, 1997. p. 311-329.

WINTER, J. P.; ZHANG, Z.; TENUTA, M.; VORONEY, R. P. Measurement of microbial biomass by fumigation-extraction in soil stored frozen. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v. 58, p. 1645-1651, 1994.

WOLLUM, A. G. Soil sampling for microbiological analysis. In: WEAVER, R. W. et al. **Methods of Soil Analysis**, Part 2, Microbial and Biochemical Properties. Madison: SSSA, 1994. p. 1-14.

WOOMER, P. L. Most Probable Number Counts. In: WEAVER, R. W. et al. **Methods of Soil Analysis**, Part 2, Microbial and Biochemical Properties. Madison: SSSA, 1994. p. 59-79.

YANG, J. C., INSAN, H. **J.Trop. Ecol.**, 7:383, 1991

ZELLES, L.; ADRIAN, P.; BAI, Q. Y.; STEPPER, K.; ADRIAN, M. V.; FISCHER, K.; MAIER, A.; ZIEGLER, A. Microbial activity measured in soils stored under different temperature and humidity conditions. **Soil Biol. Biochem.**, Oxford, v. 23, p. 955-962, 1991.

7 ANEXOS

ANEXO 1 Meio de cultura de MARTIN utilizado para fungos

Reagentes	Concentração (g)
KH ₂ PO ₄	1,0
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0,5
Peptona	5,0
Glicose	10,0
Rosa Bengala	0,06
Streptomicina	0,2
Água destilada	1000 ml

ANEXO 2 Meio de cultura de utilizado para bactérias

Reagentes	Concentração (g)
KH ₂ PO ₄	1,0
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0,5
Peptona	5,0
Glicose	10,0
Ciclohexamida	0,04
Água destilada	1000 ml

ANEXO 3 Tabela de determinação do número mais provável utilizada no experimento, para 5 tubos por diluição, com diluição decimal, sendo p_1 , p_2 e p_3 o número de tubos positivos nas diluições subsequentes (SCHINNER, 1996).

p_1	p_2	p_3					
		0	1	2	3	4	5
0	0	-	0.018	0.036	0.054	0.072	0.090
0	1	0.018	0.036	0.055	0.073	0.091	0.11
0	2	0.037	0.055	0.074	0.092	0.11	0.13
0	3	0.056	0.074	0.093	0.11	0.13	0.15
0	4	0.075	0.094	0.11	0.13	0.15	0.17
0	5	0.094	0.11	0.13	0.15	0.17	0.19
1	0	0.020	0.040	0.060	0.080	0.10	0.12
1	1	0.040	0.061	0.081	0.10	0.12	0.14
1	2	0.061	0.082	0.10	0.12	0.15	0.17
1	3	0.083	0.10	0.13	0.15	0.17	0.19
1	4	0.11	0.13	0.15	0.17	0.19	0.22
1	5	0.13	0.15	0.17	0.19	0.22	0.24
2	0	0.045	0.068	0.091	0.12	0.14	0.16
2	1	0.068	0.092	0.12	0.14	0.17	0.19
2	2	0.093	0.12	0.14	0.17	0.19	0.22
2	3	0.12	0.14	0.17	0.20	0.22	0.25
2	4	0.15	0.17	0.20	0.23	0.25	0.28
2	5	0.17	0.20	0.23	0.26	0.29	0.32
3	0	0.078	0.11	0.13	0.16	0.20	0.23
3	1	0.11	0.14	0.17	0.20	0.23	0.27
3	2	0.14	0.17	0.20	0.24	0.27	0.31
3	3	0.17	0.21	0.24	0.28	0.31	0.35
3	4	0.21	0.24	0.28	0.32	0.36	0.40
3	5	0.25	0.29	0.32	0.37	0.41	0.45
4	0	0.13	0.17	0.21	0.25	0.30	0.36
4	1	0.17	0.21	0.26	0.31	0.36	0.42
4	2	0.22	0.26	0.32	0.38	0.44	0.50
4	3	0.27	0.33	0.39	0.45	0.52	0.59
4	4	0.34	0.40	0.47	0.54	0.62	0.69
4	5	0.41	0.48	0.56	0.64	0.72	0.81
5	0	0.23	0.31	0.43	0.58	0.76	0.95
5	1	0.33	0.46	0.64	0.84	1.1	1.3
5	2	0.49	0.70	0.95	1.2	1.5	1.8
5	3	0.79	1.1	1.4	1.8	2.1	2.5
5	4	1.3	1.7	2.2	2.8	3.5	4.3
5	5	2.4	3.5	5.4	9.2	16	-

ANEXO 4 Leituras de tubos positivos por tratamento, seguido do valor NMP e dos valores corrigidos pela diluição e umidade da amostra.

4.1 Para 3 dias de armazenamento

FUNGOS						
Tratamento	Diluições			C. Diluição	C. Umidade	
	2	3	4			
Fr	5	1	0	0,33	3300	3508
Fr	5	1	0	0,33	3300	3508
Fc	5	2	0	0,49	4900	5209
Fc	5	1	0	0,33	3300	3508
Fcg	5	1	0	0,33	3300	3508
Fcg	5	1	0	0,33	3300	3508
For	4	1	0	0,17	1700	1807
For	5	1	0	0,33	3300	3508
Foc	5	1	0	0,33	3300	3508
Foc	4	1	0	0,17	1700	1807
Focg	5	1	0	0,33	3300	3508
Focg	5	1	0	0,33	3300	3508

BACTÉRIAS						
Tratamento	Diluições			C. Diluição	C. Umidade	
	4	5	6			
Br	5	3	2	1,40	1400000	1488200
Br	5	3	1	1,10	1100000	1169300
Bc	5	1	0	0,33	330000	350790
Bc	5	3	1	1,10	1100000	1169300
Bcg	5	4	0	1,30	1300000	1381900
Bcg	5	1	2	0,64	640000	680320
Bor	5	2	1	0,70	700000	744100
Bor	5	3	2	1,40	1400000	1488200
Boc	5	2	2	0,95	950000	1009850
Boc	5	3	2	1,40	1400000	1488200
Bocg	5	1	1	0,46	460000	488980
Bocg	5	2	2	0,95	950000	1009850

4.2 Para 7 dias de armazenamento

FUNGOS						
Tratamento	Diluições			C. diluição	C. Umidade	
	2	3	4			
Fr	4	2	0	0,22	2200	2339
Fr	5	1	0	0,33	3300	3508
Fc	5	1	0	0,33	3300	3508
Fc	5	2	0	0,49	4900	5209
Fcg	5	2	0	0,49	4900	5209
Fcg	5	0	0	0,23	2300	2445
For	3	0	0	0,08	780	829
For	5	0	0	0,23	2300	2445
Foc	5	0	0	0,23	2300	2445
Foc	3	0	0	0,08	780	829
Focg	3	2	1	0,17	1700	1807
Focg	3	0	0	0,08	780	829

BACTÉRIAS						
Tratamento	Diluições			C. diluição	C. Umidade	
	4	5	6			
Br	3	1	0	0,11	110000	116930
Br	3	1	0	0,11	110000	116930
Bc	4	1	2	0,26	260000	276380
Bc	5	3	1	1,10	1100000	1169300
Bcg	4	3	1	0,33	330000	350790
Bcg	5	3	2	1,40	1400000	1488200
Bor	5	1	0	0,33	330000	350790
Bor	4	2	2	0,32	320000	340160
Boc	3	2	1	0,17	170000	180710
Boc	5	1	1	0,46	460000	488980
Bocg	4	1	0	0,17	170000	180710
Bocg	4	2	0	0,22	220000	233860

4.3 Para 14 dias de armazenamento

FUNGOS						
Tratamento	Diluições			C. diluição	C. umidade	
	2	3	4			
Fr	4	1	0	0,13	1300	1382
Fr	5	0	0	0,23	2300	2445
Fc	5	0	0	0,23	2300	2445
Fc	5	1	0	0,33	3300	3508
Fcg	5	1	0	0,33	3300	3508
Fcg	5	1	0	0,33	3300	3508
For	5	1	0	0,33	3300	3508
For	4	0	0	0,13	1300	1382
Foc	4	0	0	0,13	1300	1382
Foc	5	0	0	0,23	2300	2445
Focg	5	1	1	0,46	4600	4890
Focg	5	0	0	0,23	2300	2445

BACTÉRIAS						
Tratamento	Diluições			C. diluição	C. umidade	
	4	5	6			
Br	5	3	1	1,10	1100000	1169300
Br	4	0	0	0,13	130000	138190
Bc	5	1	0	0,33	330000	350790
Bc	4	2	1	0,26	260000	276380
Bcg	5	4	0	1,30	1300000	1381900
Bcg	5	2	0	0,49	490000	520870
Bor	5	3	0	0,79	790000	839770
Bor	4	2	1	0,26	260000	276380
Boc	5	2	1	0,70	700000	744100
Boc	5	3	1	1,10	1100000	1169300
Bocg	3	1	1	0,14	140000	148820
Bocg	5	3	1	1,10	1100000	1169300

4.4 Para 21 dias de armazenamento

FUNGOS 23-12-00						
Tratamento	Diluições			C. diluição	C. umidade	
	2	3	4			
Fr	5	1	0	0,33	3300	3508
Fr	5	0	0	0,23	2300	2445
Fc	5	0	0	0,23	2300	2445
Fc	4	1	0	0,17	1700	1807
Fcg	5	0	0	0,23	2300	2445
Fcg	5	2	0	0,49	4900	5209
For	5	2	0	0,49	4900	5209
For	5	0	0	0,23	2300	2445
Foc	4	1	0	0,17	1700	1807
Foc	5	0	0	0,23	2300	2445
Focg	5	2	1	0,70	7000	7441
Focg	5	0	1	0,31	3100	3295

BACT						
Tratamento	Diluições			C. diluição	C. umidade	
	4	5	6			
Br	4	0	0	0,13	130000	138190
Br	5	0	0	0,23	230000	244490
Bc	5	1	0	0,33	330000	350790
Bc	5	1	0	0,33	330000	350790
Bcg	5	2	0	0,49	490000	520870
Bcg	5	1	1	0,46	460000	488980
Bor	3	1	0	0,11	110000	116930
Bor	5	2	0	0,49	490000	520870
Boc	5	1	0	0,33	330000	350790
Boc	5	1	0	0,33	330000	350790
Bocg	5	2	1	0,95	950000	1009850
Bocg	5	2	1	0,70	700000	744100

4.5 Para 35 dias de armazenamento

FUNGOS						
Tratamento	Diluições			C. diluição	C. umidade	
	2	3	4			
Fr	5	2	0	0,49	4900	5209
Fr	5	1	0	0,33	3300	3508
Fc	5	1	0	0,33	3300	3508
Fc	5	2	0	0,49	4900	5209
Fcg	5	3	0	0,79	7900	8398
Fcg	4	2	0	0,22	2200	2339
For	5	3	0	0,79	7900	8398
For	5	2	1	0,70	7000	7441
Foc	5	2	0	0,49	4900	5209
Foc	5	1	0	0,33	3300	3508
Focg	5	2	0	0,49	4900	5209
Focg	5	1	0	0,33	3300	3508

BACTÉRIAS						
Tratamento	Diluições			C. diluição	C. umidade	
	4	5	6			
Br	5	1	0	0,33	330000	350790
Br	4	2	1	0,26	260000	276380
Bc	5	2	1	0,70	700000	744100
Bc	5	2	1	0,70	700000	744100
Bcg	5	1	0	0,33	330000	350790
Bcg	5	3	2	1,40	1400000	1488200
Bor	5	3	0	0,79	790000	839770
Bor	5	3	0	0,79	790000	839770
Boc	4	1	0	0,17	170000	180710
Boc	5	2	0	0,49	490000	520870
Bocg	5	3	0	0,79	790000	839770
Bocg	5	2	2	0,95	950000	1009850

4.6 Para 42 dias de armazenamento

FUNGOS						
Tratamento	Diluições			C. diluição	C. umidade	
	2	3	4			
Fr	4	2	0	0,22	2200	2339
Fr	4	2	0	0,22	2200	2339
Fc	5	2	0	0,49	4900	5209
Fc	5	1	0	0,33	3300	3508
Fcg	3	1	0	0,11	1100	1169
Fcg	5	0	0	0,23	2300	2445
For	5	0	0	0,23	2300	2445
For	4	0	0	0,13	1300	1382
Foc	4	1	0	0,17	1700	1807
Foc	5	0	0	0,23	2300	2445
Focg	4	0	0	0,13	1300	1382
Focg	5	1	0	0,33	3300	3508

BACTÉRIAS						
Tratamento	Diluições			C. diluição	C. umidade	
	4	5	6			
Br	4	3	1	0,33	330000	350790
Br	4	3	1	0,33	330000	350790
Bc	5	3	1	1,10	1100000	1169300
Bc	4	3	1	0,33	330000	350790
Bcg	5	2	1	0,70	700000	744100
Bcg	5	2	0	0,49	490000	520870
Bor	5	2	0	0,49	490000	520870
Bor	4	1	0	0,17	170000	180710
Boc	5	3	1	1,10	1100000	1169300
Boc	5	2	0	0,49	490000	520870
Bocg	5	1	1	0,46	460000	488980
Bocg	5	2	0	0,49	490000	520870

4.7 Para 49 dias de armazenamento

FUNGOS						
Tratamento	Diluições			C. diluição	C. umidade	
	2	3	4			
Fr	3	0	0	0,08	780	829
Fr	2	1	0	0,07	680	723
Fc	5	0	0	0,23	2300	2445
Fc	2	2	0	0,09	930	989
Fcg	2	0	0	0,05	450	478
Fcg	5	0	0	0,23	2300	2445
For	5	0	0	0,23	2300	2445
For	5	1	0	0,33	3300	3508
Foc	5	0	0	0,23	2300	2445
Foc	4	1	0	0,17	1700	1807
Focg	2	0	0	0,05	450	478
Focg	2	0	0	0,05	450	478

BACTÉRIAS						
Tratamento	Diluições			C. diluição	C. umidade	
	4	5	6			
Br	4	0	0	0,13	130000	138190
Br	5	0	0	0,23	230000	244490
Bc	5	2	1	0,70	700000	744100
Bc	5	2	1	0,70	700000	744100
Bcg	5	1	0	0,33	330000	350790
Bcg	4	1	0	0,17	170000	180710
Bor	3	3	0	0,17	170000	180710
Bor	5	3	0	0,79	790000	839770
Boc	5	2	0	0,49	490000	520870
Boc	5	2	0	0,49	490000	520870
Bocg	5	2	1	0,70	700000	744100
Bocg	5	1	1	0,33	330000	350790

4.8 Para 292 dias de armazenamento

FUNGOS						
Tratamento	Diluições			C. diluição	C. umidade	
	2	3	4			
Fr	5	2	0	0,49	4900	5209
Fr	5	2	0	0,49	4900	5209
Fc	5	1	1	0,46	4600	4890
Fc	5	1	0	0,33	3300	3508
Fcg	5	2	0	0,49	4900	5209
Fcg	5	1	0	0,33	3300	3508
For	5	1	0	0,33	3300	3508
For	5	3	0	0,79	7900	8398
Foc	5	1	0	0,33	3300	3508
Foc	5	1	1	0,46	4600	4890
Focg	5	1	0	0,33	3300	3508
Focg	5	2	1	0,70	7000	7441

BACTÉRIAS						
Tratamento	Diluições			C. diluição	C. umidade	
	4	5	6			
Br	4	1	0	0,17	170000	180710
Br	4	1	0	0,17	170000	180710
Bc	5	2	0	0,49	490000	520870
Bc	5	1	0	0,33	330000	350790
Bcg	5	2	1	0,70	700000	744100
Bcg	5	1	1	0,46	460000	488980
Bor	3	1	0	0,11	110000	116930
Bor	3	2	0	0,14	140000	148820
Boc	5	1	1	0,46	460000	488980
Boc	5	2	0	0,49	490000	520870
Bocg	5	2	0	0,70	700000	744100
Bocg	5	2	0	0,70	700000	744100

ANEXO 5 Limites de confiança máximo e mínimo dos valores de NMP obtidos em cada data de determinação para a população de fungos e de bactérias.

5.1 Para fungos

Limites de confiança máximo e mínimo dos valores de NMP para diluição decimal e 10 tubos por diluição

Datas	Fr		Fc		Fcg		For		Foc		Focg	
	máx	mín										
3	8138	1512	10111	1879	8138	1512	6165	1145	6165	1145	8138	1512
7	6782	1260	10111	1879	8878	1649	3798	706	3798	706	3058	568
14	4439	825	6905	1283	8138	1512	5672	1054	4439	825	8508	1581
21	6905	1283	4932	916	8878	1649	8878	1649	4932	916	12454	2314
35	10111	1879	10111	1879	12454	2314	18373	3414	10111	1879	10111	1879
42	5426	1008	10111	1879	4192	779	4439	825	4932	916	5672	1054
49	1800	334	3983	740	3391	630	6905	1283	4932	916	1110	206
292	12084	2245	9741	1810	10111	1879	13810	2566	9741	1810	12701	2360

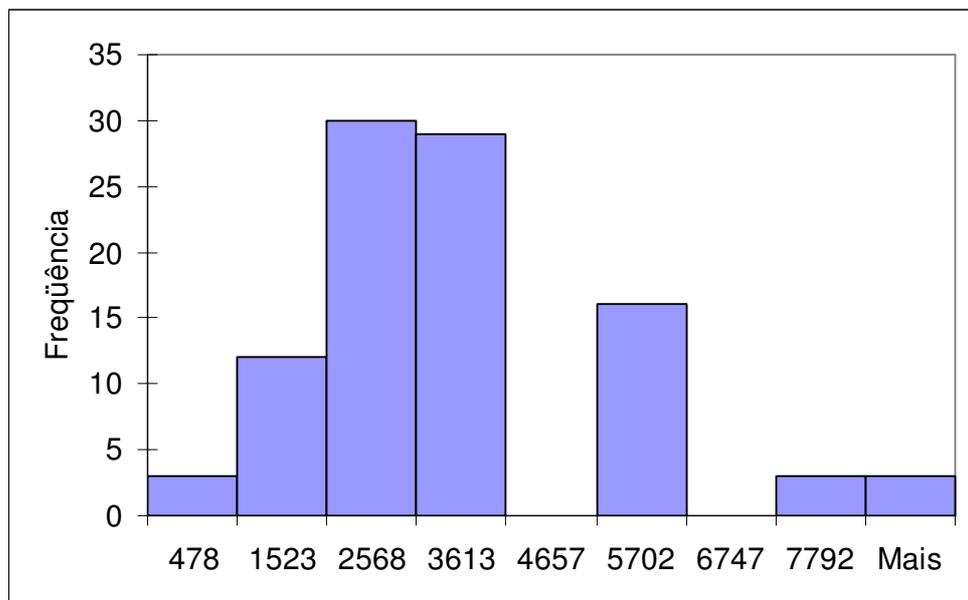
5.2 Para bactérias

Limites de confiança máximo e mínimo dos valores de NMP para diluição decimal e 10 tubos por diluição

Datas	Br		Bc		Bcg		Bor		Boc		Bocg	
	máx	mín										
3	3082700	572737	1763304	327606	2392175	444444	2589468	481099	2897738	538373	1738643	323024
7	271278	50401	1676989	311569	2133228	396334	801502	148912	776840	144330	480901	89347
14	1516688	281787	727517	135166	2207213	410080	1294734	240550	2219544	412371	1529019	284078
21	443909	82474	813833	151203	1171426	217640	739848	137457	813833	151203	2034582	378006
35	727517	135166	1726312	320733	2133228	396334	1948266	361970	813833	151203	2145559	398625
42	813833	151203	1763304	327606	1467365	272623	813833	151203	1960597	364261	1171426	217640
49	443909	82474	1726312	320733	616540	114547	1183757	219931	1208418	224513	1270072	235968
292	419247	77892	1011126	187858	1430373	265750	308270	57274	1171426	217640	1726312	320733

ANEXO 6 Histogramas de distribuição de frequência dos dados de população de fungos e bactérias obtidos em todas as datas de determinação, através da metodologia do NMP.

6.1 Para fungos



6.2 Para bactérias

