

SEÇÃO III - BIOLOGIA DO SOLO

DETERMINAÇÃO DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL DE MICROORGANISMOS DO SOLO PELO MÉTODO DE PLAQUEAMENTO POR GOTAS⁽¹⁾

M. C. JAHNEL⁽²⁾, E. J. B. N. CARDOSO⁽³⁾ & C. T. S. DIAS⁽⁴⁾

RESUMO

A determinação do número mais provável (NMP) de fungos e bactérias do solo foi realizada pelo método de plaqueamento por gotas, por meio do qual foi possível economizar meio de cultura e trabalho. O método foi apresentado e comparado com o procedimento convencional de contagem de microrganismos do solo em amostras de solo de diferentes texturas. A sensibilidade desse método foi também observada em experimentos para contagem de microrganismos quando da adição de diferentes fontes de matéria orgânica e de sais de cromo.

Termos de indexação: contagem de microrganismos, parâmetros microbiológicos.

SUMMARY: *DETERMINATION OF THE NUMBER OF SOIL MICROORGANISMS BY MEANS OF THE AGAR-DROP COUNTING*

The most probable number (MPN) for soil bacteria and fungi was determined using a micro-assay technique, which was more economical and less tedious. This technique was compared with the conventional procedure for counting soil microorganisms in soil samples with different textures. The sensitivity of this method could be also verified when used to evaluate number of microorganisms from different sources of organic matter and chromium added to the soil.

Index terms: microorganisms counting, microbiological parameter.

⁽¹⁾ Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor. Recebido para publicação em dezembro de 1997 e aprovado em abril de 1999.

⁽²⁾ Professor Dr. do Centro de Ciências Agrárias e Ambientais da PUC-PR.

⁽³⁾ Professora Titular do Departamento de Solos e Nutrição de Plantas, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - ESALQ/USP. Caixa Postal 09, CEP 13418-900 Piracicaba (SP).

⁽⁴⁾ Professor Dr. do Departamento de Matemática e Estatística, ESALQ/USP.

INTRODUÇÃO

Análises microbiológicas constituem ferramentas importantes no monitoramento da poluição do solo. No entanto, tais medidas, quando são utilizadas individualmente, não oferecem informações suficientes da ação de compostos xenobióticos sobre a comunidade microbiana do solo. Atividades microbiológicas, tais como respiração, fixação biológica de N_2 , mineralização de C e N e atividade de algumas enzimas, podem ser avaliadas juntamente com a quantificação da biomassa microbiana do solo. Combinando atividade microbiológica e estimativas de número de microrganismos, obtêm-se indicadores mais sensíveis da poluição do solo do que aqueles que seriam obtidos através da avaliação de uma única medida. Com esta abordagem, é possível avaliar a alteração do solo sem a necessidade de recorrer a longos e dispendiosos experimentos de campo (Brookes, 1995).

A contagem de bactérias e fungos é uma destas medidas e pode ser obtida diretamente por microscopia ou estimada por métodos indiretos. Neste último caso, é necessário que os propágulos existentes na amostra sejam capazes de formar colônias. Em todos os procedimentos de isolamento, os microrganismos são coletados em condições naturais e colocados em condições artificiais. Dessa maneira, qualquer que seja o método empregado, haverá alguma seleção dos microrganismos, seja pelo meio de cultura utilizado, seja pelas condições ambientais de cultivo.

De maneira geral, os processos de contagem indireta proporcionam condições de crescimento para bactérias zimógenas, ou seja, bactérias que apresentam metabolismo rápido quando na presença de matéria orgânica facilmente decomponível (Schinner et al., 1993). Pequenas alterações nas condições físico-químicas do solo afetam imediatamente os microrganismos zimógenos. A contagem de unidades formadoras de colônias é feita a partir de uma suspensão de solo por meio de diluições em série, e cada diluição é transferida para o meio de cultura. No método do número mais provável (NMP), o crescimento em placas com meio de cultura mostra que pelo menos um propágulo com condições de crescimento foi transferido. Apesar de seletivo, o método de estimativa de unidades formadoras de colônias pelo número mais provável tem sido um instrumento bastante útil no estudo de microrganismos do solo. Além dos problemas citados, tais procedimentos demandam grande quantidade de reagentes, vidraria e especialmente trabalho, impossibilitando, dessa forma, sua utilização em larga escala.

O presente trabalho objetivou desenvolver um método simplificado de contagem de microrganismos e verificar a viabilidade da substituição do método tradicional de diluição e plaqueamento para contagem de microrganismos em amostras de solo.

MATERIAL E MÉTODOS

Para avaliar a viabilidade do método proposto, foram realizados quatro experimentos, ocasião em que foi verificada a sensibilidade do método às alterações de solo, tratamento e procedimento de diluição.

Os experimentos realizados foram: (a) comparação de dados obtidos por método tradicional e método proposto; (b) comparação de dados obtidos pelo método tradicional e pelo método proposto em solos de diferentes texturas; (c) avaliação do efeito de agentes desagregantes; (d) verificação da sensibilidade do método proposto à adição de metais pesados na forma de sal e diferentes fontes de matéria orgânica.

Descrição do método proposto

No método de plaqueamento por gotas, foram utilizados os meios de cultura ágar nutriente (Burnett et al., 1957), para determinação de bactérias, e o meio de Martin, com exclusão do rosa-bengala, para determinação de fungos (Martin, 1950). A composição dos meios utilizados foi a seguinte: Ágar Nutriente (1.000 mL água, 10 g ágar, 3 g extrato de carne, 10 g NaCl, 5 g peptona); Meio de Martin (1.000 mL água, 10 g ágar, 1 g KH_2PO_4 , 1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 5 g peptona, 10 g dextrose, 0,03 g estreptomocina).

Os tubos de ensaio, após receber em 0,9 mL do meio de cultura correspondente, foram autoclavados, por 20 min a $120^\circ C$ (1 atm) e, posteriormente, foram mantidos em banho-maria a $45^\circ C$ para que o meio de cultura permanecesse em estado líquido. Para efetuar a série de diluições, obteve-se uma suspensão, em frasco Erlenmeyer, utilizando-se 10 g de terra e 90 mL de solução salina de NaCl a 0,85%. A partir dessa suspensão, foram realizadas diluições sucessivas com alíquotas de 0,1 mL nos tubos de ensaio que continham 0,9 mL de meio de cultura, mantidos em banho-maria até o momento do plaqueamento.

O plaqueamento do meio de cultura foi realizado, com o auxílio de micropipeta, em capela de fluxo laminar, com 25 gotas de 0,04 mL em placas de Petri esterilizadas. As placas foram vedadas com parafilm®, para impedir perda de água, e incubadas em estufa para D.B.O. (demanda bioquímica de oxigênio), a $28^\circ C$ por um período de 48 h. Após o período de incubação, foi verificado, com o auxílio de uma lupa, o número de gotas positivas, ou seja, aquelas em que ocorreu o crescimento de pelo menos um microrganismo do grupo de interesse. O crescimento em uma gota mostra que pelo menos um propágulo, capaz de se desenvolver, foi transferido para o meio de cultura. A partir dos resultados obtidos em cada uma das diluições, pode-se estimar o número mais provável (NMP) de microrganismos com o auxílio de uma tabela de probabilidade de ocorrência - Tabela de McCrady (Hungria & Araujo, 1994).

Experimento 1

No primeiro experimento, foi utilizada uma amostra de solo seca ao ar e peneirada em tamis com 2 mm de malha. As características químicas da amostra estão listadas no quadro 1. Para cada método de quantificação de microrganismos, foram realizadas seis repetições e foram determinados o NMP de bactérias e o NMP de fungos. As diluições foram feitas, utilizando-se suspensão de 10 g de terra em 90 mL de solução salina de NaCl a 0,85%. Os frascos Erlenmeyer que continham as suspensões foram agitados, por 10 min, em agitador com movimento circular-horizontal. A partir desse frasco, foram preparadas diluições para o procedimento convencional e para o plaqueamento por gotas.

No procedimento tradicional de contagem de microrganismos, foram realizadas diluições sucessivas com solução salina em frascos Erlenmeyer até o fator de diluição de 10^{-3} , utilizando-se alíquotas de 10 mL da diluição anterior. A partir deste ponto, as diluições subseqüentes foram efetuadas com alíquotas de 1 mL transferidas para tubo de ensaio com 9 mL de solução salina até se atingir a diluição 10^{-8} , para bactérias, e 10^{-6} , para fungos.

Após a diluição, a alíquota correspondente foi transferida para tubos de ensaio que continham os mesmos meios de cultura utilizados para o método de plaqueamento por gotas. Os tubos foram incubados a 28°C , por um período de 48 h, no método de plaqueamento por gotas, e por 72 h, para bactérias, e 120 h, para fungos, no método tradicional. Após o período de incubação, foi feita a contagem de tubos e, ou, gotas com ou sem crescimento para calcular o número mais provável de microrganismos (Hungria & Araujo, 1994).

Experimento 2

No segundo experimento, foram utilizadas três amostras de solo secas ao ar (TFSA), de texturas

distintas, cujas características estão listadas no quadro 2. Neste experimento, foram feitas cinco repetições para cada solo, e as variáveis observadas foram NMP de bactérias e de fungos. Os procedimentos neste experimento foram os mesmos indicados para o método de plaqueamento por gotas e tradicional já descritas.

Experimento 3

Neste terceiro experimento, pretendeu-se verificar até que ponto a presença de algum agente desagregante poderia destruir agregados em solo argiloso com elevados teores de matéria orgânica, o que poderia afetar a contagem do número mais provável de microrganismos. Para isso, foram utilizados 300 g de solo argiloso (Quadro 1), adicionados de 7,14 g de lodo de curtume seco (Quadro 4). O vaso permaneceu, por um período de 25 dias, em sala climatizada a 28°C , tendo sido a umidade mantida próxima à capacidade de campo durante todo esse período. Os agentes desagregantes utilizados foram lavados em água destilada e autoclavados junto com a solução salina empregada na primeira diluição das amostras.

Os tratamentos foram: (a) testemunha; (b) 5 g de areia lavada; (c) uma esfera de vidro com 3 mL de volume; (d) dez pérolas de vidro.

Experimento 4

Neste experimento pretendeu-se avaliar a sensibilidade do método de plaqueamento por gotas quando da adição de matéria orgânica, sal de crômio e tempo de incubação na determinação de microrganismos do solo.

Quadro 1. Características químicas e físicas da amostra de solo utilizada no experimento 1

| Característica | Valor |
|--|-------|
| pH (CaCl_2) | 5,5 |
| M.O. (g dm^{-3}) | 33 |
| P resina (mg dm^{-3}) | 44 |
| K^+ ($\text{mmol}_c \text{ dm}^{-3}$) | 7,5 |
| Ca^{2+} ($\text{mmol}_c \text{ dm}^{-3}$) | 73 |
| Mg^{2+} ($\text{mmol}_c \text{ dm}^{-3}$) | 21 |
| H + Al ($\text{mmol}_c \text{ dm}^{-3}$) | 20 |
| S ($\text{mmol}_c \text{ dm}^{-3}$) | 10,2 |
| T ($\text{mmol}_c \text{ dm}^{-3}$) | 12,2 |
| V % | 84 |

Quadro 2. Características químicas e físicas das amostras de solos utilizadas no experimento 2

| Característica | Amostra 1 | Amostra 2 | Amostra 3 |
|--|-----------|-----------|-----------|
| pH (CaCl_2) | 7,6 | 4,3 | 5,2 |
| M.O. (g dm^{-3}) | 150,0 | 8 | 18 |
| P resina (mg dm^{-3}) | 36 | 28 | 23 |
| K^+ ($\text{mmol}_c \text{ dm}^{-3}$) | 6,8 | 2,7 | 1,4 |
| Ca^{2+} ($\text{mmol}_c \text{ dm}^{-3}$) | 470 | 21 | 25 |
| Mg^{2+} ($\text{mmol}_c \text{ dm}^{-3}$) | 270 | 4 | 5 |
| Al^{3+} ($\text{mmol}_c \text{ dm}^{-3}$) | 0 | 10 | 0 |
| H + Al ($\text{mmol}_c \text{ dm}^{-3}$) | 1 | 58 | 32 |
| S ($\text{mmol}_c \text{ dm}^{-3}$) | 747 | 28 | 31 |
| T ($\text{mmol}_c \text{ dm}^{-3}$) | 748 | 86 | 63 |
| V % | 100 | 33 | 49 |
| Saturação por Al^{3+} % | 0 | 26 | 0 |
| Areia fina % | 24 | 74 | 82 |
| Silte % | 24 | 8 | 4 |
| Argila % | 52 | 18 | 14 |

Quadro 3. Características químicas da amostra de solo e dos resíduos orgânicos utilizados no experimento 3

| Característica | Solo | Composto | Bagaço de Cana |
|----------------------------|---|--------------------------|-------------------------|
| pH (CaCl ₂) | 5,5 | 6,8 | 4,9 |
| M.O. (g dm ⁻³) | 33 | 274,6 | 955,8 |
| P | 44 (mg dm ⁻³) | 2,2 g kg ⁻¹ | 0,09 g kg ⁻¹ |
| K ⁺ | 7,5 (mmol _c dm ⁻³) | 2,9 g kg ⁻¹ | 1,1 g kg ⁻¹ |
| Ca ²⁺ | 73 (mmol _c dm ⁻³) | 12,8 g kg ⁻¹ | 0,2 g kg ⁻¹ |
| Mg ²⁺ | 21 (mmol _c dm ⁻³) | 2,1 g kg ⁻¹ | 0,4 g kg ⁻¹ |
| N total | - | 19,2 g kg ⁻¹ | 2,9 g kg ⁻¹ |
| H + Al | 20 (mmol _c dm ⁻³) | | |
| S | 102 (mmol _c dm ⁻³) | | |
| T | 122 (mmol _c dm ⁻³) | | |
| V % | 84 | | |
| Umidade | | 474,6 g kg ⁻¹ | 56,0 g kg ⁻¹ |
| Cinzas | | 725,4 g kg ⁻¹ | 44,2 g kg ⁻¹ |
| Relação C/N | | 8/1 | 185/1 |

Quadro 4. Características químicas do lodo de curtume

| Característica | Valor |
|--|--------|
| pH (CaCl ₂) | 7,3 |
| Matéria orgânica total (g dm ⁻³) | 721,1 |
| Matéria orgânica compostável (g dm ⁻³) | 718,0 |
| Resíduo mineral total (g dm ⁻³) | 278,9 |
| Resíduo mineral solúvel (g dm ⁻³) | 253,3 |
| N total (g dm ⁻³) | 39,6 |
| P resina (mg dm ⁻³) | 1,57 |
| K (mmol _c dm ⁻³) | 0,75 |
| Ca (mmol _c dm ⁻³) | 80,2 |
| Mg (mmol _c dm ⁻³) | 1,9 |
| S (mmol _c dm ⁻³) | 12,9 |
| Cu (mg kg ⁻¹) | 156 |
| Mn (mg kg ⁻¹) | 4.495 |
| Zn (mg kg ⁻¹) | 176 |
| Fe (mg kg ⁻¹) | 2.425 |
| Na (mg kg ⁻¹) | 13.772 |
| Cd (mg kg ⁻¹) | 10 |
| Cr (mg kg ⁻¹) | 24.000 |

As fontes de matéria orgânica utilizadas foram bagaço de cana seco e moído e composto orgânico obtido após período de compostagem de 60 dias. A amostra de solo utilizada foi seca ao ar e peneirada em tamis de 2 mm. O experimento foi instalado em um fatorial com seis diferentes combinações de resíduo orgânico e solo, quatro datas de coleta e três repetições em delineamento completamente casualizado, totalizando 72 parcelas. As amostras de solo com os respectivos tratamentos foram mantidas em copos plásticos perfurados, com capacidade de 300 mL, em sala climatizada com temperatura constante de 28°C, por um período de 28 dias.

Os tratamentos foram os seguintes: (a) solo; (b) solo + bagaço de cana (10 g kg⁻¹ de solo); (c) solo + composto (30 g kg⁻¹ de solo); (d) solo + solução de Cr; (e) solo + bagaço de cana (10 g kg⁻¹ de solo) + solução de Cr; (f) solo + bagaço de cana (10 g kg⁻¹ de solo) + composto (30 g kg⁻¹ de solo) + solução de Cr.

No preparo da solução de Cr, foi utilizado dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) dissolvido em água destilada, sendo essa solução aplicada no solo durante a montagem do experimento no volume necessário para a obtenção de 50 mg kg⁻¹ de Cr no solo. Semanalmente, foram avaliados a produção de CO₂, pelo método de Öhlinger (1993) e o NMP de fungos e bactérias, de acordo com os procedimentos já descritos.

Para efetuar as análises estatísticas, foi necessária a transformação dos dados, atendendo às pressuposições da análise de variância.

No experimento 1, os dados foram transformados em log NMP. Para os dados referentes à contagem de bactérias, no experimento 2, foi feita a transformação NMP^{0,3} e foi aplicado log NMP para os dados de contagem de fungos. No experimento 3, os dados obtidos foram transformados em 1/NMP e, para a realização da análise estatística da contagem de bactérias e fungos, no experimento 4, os dados foram transformados em log NMP. Todas as transformações foram realizadas conforme sugestão do programa estatístico SAS.

As médias foram comparadas com o auxílio do programa estatístico SAS, por meio do teste t de Student a 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1

Os resultados obtidos mostraram que, para bactérias, as contagens foram da ordem de 10⁶ e, para

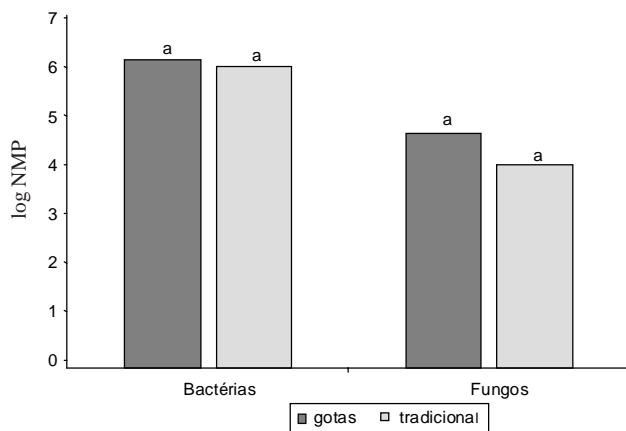
fungos, de 10^4 . Apesar de a contagem pelo método de plaqueamento por gotas ser ligeiramente superior aos resultados obtidos pela contagem tradicional, esta diferença não se mostrou estatisticamente significativa tanto para fungos como para bactérias (Figura 1).

Experimento 2

Neste experimento, foi avaliado se haveria efeito da textura do solo sobre o método de contagem de microrganismos.

Segundo os resultados, apesar da diferença obtida em valores absolutos entre os dois métodos, o de gotas, com menor custo em trabalho e reagentes, foi capaz de apontar as mesmas tendências que o método tradicional de contagem de microrganismos (Figuras 2 e 3).

Foi observado efeito significativo do método empregado e da textura do solo, não ocorrendo, no entanto, interação da textura do solo e o método de contagem empregado, indicando não ter a textura do solo interferido no método de avaliação de microrganismos. Interessante, no entanto, é que, independentemente do método empregado, a amostra de número dois foi a que apresentou menor número de bactérias em ambos os métodos empregados. Ou seja, ambos os métodos foram capazes de identificar qual solo continha menor número de microrganismos. Para fungos, percebeu-se que, em todas as amostras de solo estudadas e independentemente do método utilizado, o número de microrganismos ficou entre 10^3 e 10^4 organismos por grama de solo. Apesar de existir efeito do método empregado na determinação do NMP, tanto de bactérias como de fungos, não houve interação dos solos estudados.



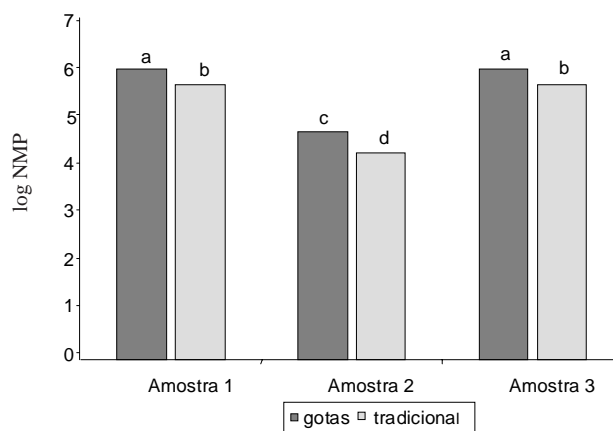
Letras, nas colunas, comparam os métodos de determinação entre si pelo teste de Student a 5%.

Figura 1. NMP de bactérias e fungos em amostra de solo, determinados pelo métodos de plaqueamento de gotas e tradicional.

Experimento 3

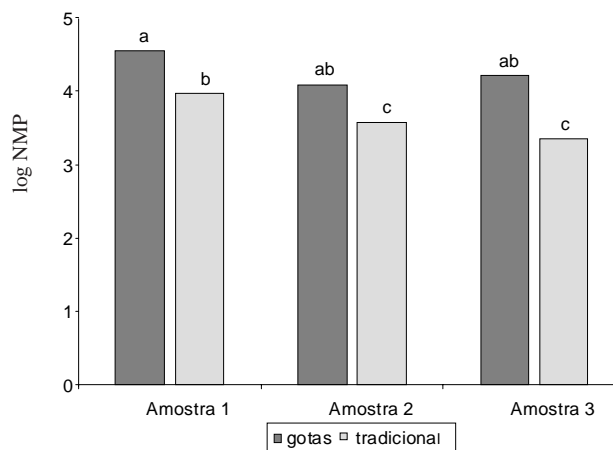
Na determinação do NMP de fungos não ocorreu nenhuma diferença decorrente do uso de desagregantes. Já para a contagem de bactérias, verificou-se que o uso de esfera de vidro aumentou significativamente o resultado final obtido (Figura 4).

As bactérias apresentam tamanho bastante próximo ao das partículas de argila (aproximadamente $2 \mu\text{m}$) e existe a possibilidade de aderência de até 90% dos microrganismos do solo às partículas de argila (Tsai et al., 1992).



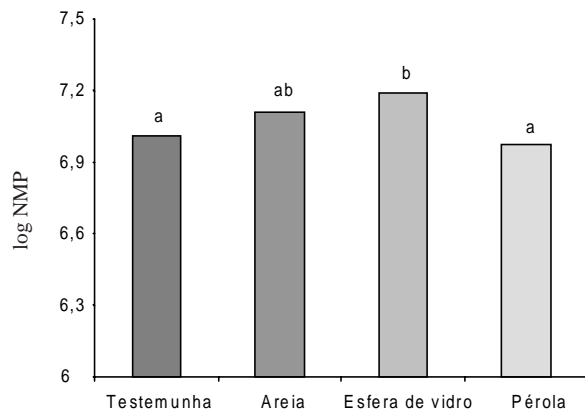
Colunas seguidas por letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Student a 5%.

Figura 2. NMP de bactérias em amostras de três solos de diferentes texturas, determinados pelos métodos de plaqueamento de gotas e tradicional.



Colunas seguidas por letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Student a 5%.

Figura 3. NMP de fungos em amostras de três solos de diferentes texturas, determinados pelos métodos de plaqueamento de gotas e tradicional.



Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Student a 5%.

Figura 4. NMP de bactérias em amostra de solo, considerando o uso de diferentes desagregantes durante a primeira diluição, determinados pelos métodos de plaqueamento de gotas.

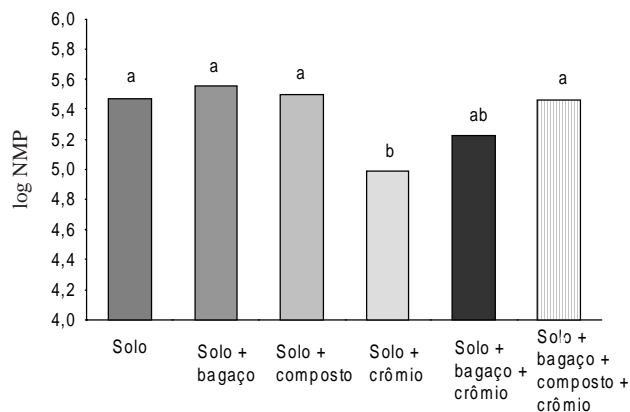
O método de quantificação de microrganismos por meio do NMP parte do princípio de que os organismos na suspensão apresentam distribuição homogênea e aleatória. O uso de desagregantes tem como função destruir agregados que poderiam indisponibilizar, para a contagem, os microrganismos contidos em seu interior. Pelo seu tamanho, as bactérias têm muito mais chance de se encontrarem ocultas dentro de agregados do solo que os esporos fúngicos; estes, por apresentarem tamanho superior ao das bactérias, não foram afetados pela destruição de agregados.

Em alguns casos, como no estudo de microrganismos da rizosfera de gramíneas, deve-se levar em consideração a grande produção de exopolissacarídeos que favorecem a formação de agregados, podendo, assim, subestimar um número relativamente grande de bactérias.

Experimento 4

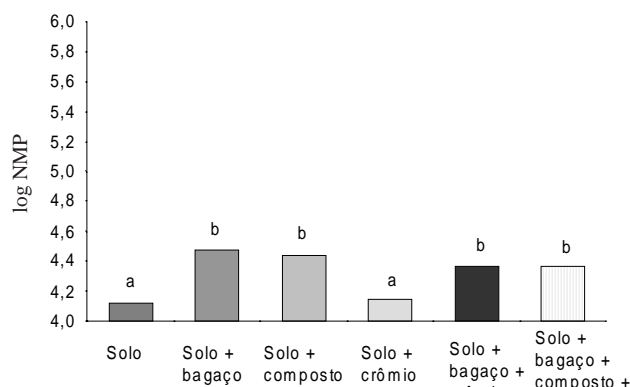
Os resultados de contagem de bactérias evidenciaram que não houve efeito do tempo de incubação. Já a adição de sal de crômio diminuiu significativamente o número de bactérias por grama de solo (Figura 5), enquanto os fungos mostraram maior tolerância, não havendo diferenças entre o solo sem adição de matéria orgânica e o solo + crômio (Figura 6).

A redução do número de bactérias em amostras de solo que receberam sal de crômio também foi observada por Ueda et al. (1988). A adição de matéria orgânica favoreceu o aumento no número de microrganismos mesmo na presença de sal de crômio. A permanência do mesmo número de fungos em solos contaminados por metal, quando comparado à testemunha, não significa que não esteja ocorrendo



Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Student a 5%.

Figura 5. NMP de bactérias em amostras de solo que receberam ou não resíduo orgânico e, ou, sal de crômio.



Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Student a 5%.

Figura 6. NMP de fungos em amostras de solo que receberam ou não resíduo orgânico e, ou, sal de crômio.

efeito prejudicial sobre esses organismos. Pode estar ocorrendo diminuição no número de microrganismos sensíveis ao crômio e um acréscimo proporcional no número de indivíduos resistentes (Doelman & Haanstra, 1979; Ueda, et al., 1988).

Com base nos dados obtidos, verificou-se maior tolerância dos fungos, quando comparados às bactérias, diferentemente do que foi encontrado por Ueda et al. (1988). No entanto, não se admite que a manutenção do mesmo número de microrganismos em amostras de solo que receberam sal de crômio indique que o metal seja inócuo aos microrganismos. Alterações no nível de atividade metabólica ou modificações na composição da comunidade do solo podem estar ocorrendo sem que a contagem final de microrganismos seja alterada.

A maior parte das observações permaneceu na ordem de 10^5 unidades formadoras de colônias (UFC), para bactérias, e de 10^4 , para fungos, por grama de solo. O tratamento que recebeu apenas crômio na forma de sal apresentou menor número de bactérias por grama de solo, diferindo da maioria dos demais tratamentos a 1% de probabilidade.

É interessante observar que a presença simultânea de bagaço de cana e de composto diminuiu o efeito prejudicial do crômio, por favorecer o crescimento de maior número de microrganismos, ou por diminuir a disponibilidade do crômio pelo aumento de CTC, ou pela formação de complexos de crômio com a matéria orgânica. Deve-se considerar que a adição de matéria orgânica estimulou a multiplicação de microrganismos e que a presença do sal de crômio atuou como inibidor deste crescimento ou mesmo como fator de seleção. Os tratamentos que não receberam sal de crômio não revelaram diferenças significativas entre si para NMP de bactérias.

Não se observou redução no NMP de fungos em solos que receberam somente crômio quando comparados com a testemunha (Figura 6). No entanto, foi observado aumento no número de fungos quando da adição de bagaço ou de composto. Não houve diferença na contagem de fungos entre os tratamentos que receberam matéria orgânica com aqueles que receberam matéria orgânica e sal de crômio. Já o tratamento que recebeu somente sal de crômio apresentou menor número de fungos durante todo o período de incubação.

CONCLUSÕES

1. O método de quantificação de bactérias e fungos em amostras de solo por plaqueamento de gotas proporcionou a obtenção de resultados semelhantes àqueles obtidos pelo procedimento tradicional, com a vantagem de economia de reagentes e trabalho.

2. Esse método mostrou-se sensível a alterações na amostra, resultantes da adição de matéria orgânica e sal de crômio.

LITERATURA CITADA

- BROOKES, P.C. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. *Biol. Fertil. Soils*, 19:269-279, 1995.
- BURNETT, G.W.; PELCZAR Jr., M.J. & CONN, H.J. Preparation of media. In: SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS. *Manual of microbiological methods*. New York, McGraw-Hill Book Company, 1957. 315p.
- DOELMAN, P. & HAANSTRA, L. Effects of lead on the soil bacterial microflora. *Soil Biol. Biochem.*, 11:487-491, 1979.
- HUNGRIA, M. & ARAUJO, R. *Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola*. Brasília, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1994. 542p.
- MARTIN, J.P. Use of acid, rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungus. *Soil Sci.*, 134:1528-1529, 1950.
- ÖHLINGER, R. Bestimmung der Bodenatmung im Laborversuch. In: SCHINNER, F.; ÖHLINGER, R.; KANDELER, E. & MARGESIN, R., eds. *Bodenbiologische Arbeitsmethoden*. Berlin, Springer-Verlag, 1993. p.86-90.
- SCHINNER, F.; ÖHLINGER, R.; KANDELER, E. & MARGESIN, R. *Bodenbiologische Arbeitsmethoden*. 2.ed. Berlin, Springer-Verlag, 1993. 389p.
- TSAI, S.M.; BARAIBAR, A.V.L. & ROMANI, V.L.M. Efeito de fatores do solo. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M. & NEVES, M.C.P., eds. *Microbiologia do solo*. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p.59-72.
- UEDA, K.; KOBAYASHI, M. & TAKAHASHI, E. Effect of chromate and organic amendments on the composition and activity of the microorganism flora in soil. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 34:233-240, 1988.