

O PROBLEMA DE ACUMULAÇÕES LIMOSAS DE ORIGEM  
MICROBIANA EM INDÚSTRIAS DE CHAPAS DE  
FIBRAS DA MADEIRA

AUGUSTO FERREIRA DA EIRA

— Engenheiro Agrônomo —

Prof. Dr. Paulo de Campos Torres de Carvalho

— Orientador —

Dissertação apresentada à Escola Superior de  
Agricultura «Luiz de Queiroz» da Universidade  
de São Paulo, para obtenção do título de Mestre.

PIRACICABA

Estado de São Paulo

— 1975 —

Aos meus pais,

à Cleuse, minha esposa,

e

a meu filho, Guilherme,

D E D I C O

## AGRADECIMENTOS

À Duratex S.A. Indústria e Comércio, que propiciou todo suporte à realização deste trabalho, através do Convênio estabelecido com a Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu.

Ao Professor Dr. Paulo de Campos Torres de Carvalho, pelo incentivo e orientação.

Aos Professores Dr. Ferdinando Galli, Dr. Eric Balmer e Dr. Hasime Tokeshi, pelas sugestões e revisão dos manuscritos.

Ao Professor Dr. Chukichi Kurozawa, pelo incentivo, sugestões, revisão dos manuscritos e pela inestimável ajuda nos isolamentos dirigidos a estruturas hifálicas.

Aos bolsistas da Duratex, Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup> Onaur Ruano, Eng<sup>a</sup> Agr<sup>a</sup> Eneida de Assumpção, Eng<sup>a</sup> Agr<sup>a</sup> Ilza Maria Nicoletti, Benedito Tadeu Calssolari e Agenor Martinho Correa, pelo esforço, dedicação e entusiasmo na condução de toda a fase experimental.

Ao Sr. Francisco de Assis Guimarães, pela dedicação nos levantamentos das condições ambientais da indústria, coleta de amostras, informações técnicas e incentivo na execução deste trabalho.

Ao Dr. João Bosco David, Dr. Gastão Mendes e Silva e a todo o pessoal técnico da Duratex S.A. Indústria e Comércio que, com sua ajuda contribuíram na realização da pesquisa.

Aos membros do Convênio FCMBB-DURATEX, Professor Dr. José S. Goldoni, pela elaboração dos testes fisiológicos e orientação na classificação das leveduras e, aos Professores Dr. Oswaldo G. Brasil, Dr<sup>a</sup> Maria Aparecida M. Brasil e Dr<sup>a</sup> Marney Pascoli Cereda, pela colaboração na fase experimental.

À Professora Roxy A. Demaret de Carvalho e Professor Yodiro Masuda pela confecção do "Summary".

À Professora Cleuse Castilho da Eira, pela revisão dos originais e estímulo na execução deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Fitotecnia, Sr. Hercílio A. da Rocha, Wanderley Nascimento, Custódio Pereira da Rocha, Maria Gemma Urbas e Paulo Silva, pela colaboração prestada neste trabalho.

Ao Sr. Josué Amaral e Sr<sup>a</sup> Ivonete A.D. de Aguiar e Silva, pelos trabalhos de datilografia.

Às Indústrias Monsanto S.A. e HOECHST do Brasil Química e Farmacêutica S.A., pelo fornecimento dos produtos e Boletins Técnicos.

Ao Departamento de Fitotecnia, à F.C.M.B.B. e a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização do presente trabalho.

## I N D I C E

	<u>Página</u>
1 - INTRODUÇÃO .....	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	2
3 - MATERIAL E MÉTODOS .....	11
3.1 - <u>Caracterização dos materiais limosos</u> .....	11
3.1.1 - Caracterização macroscópica .....	15
3.1.2 - Caracterização microscópica .....	15
3.2 - <u>Natureza da flora microbiana dos materiais limosos</u> .....	18
3.2.1 - Isolamento de microrganismos por diluições em série .....	18
3.2.1.1 - Análise da população microbiana...	18
3.2.1.2 - Amostragem de colônias .....	19
3.2.2 - Isolamento de microrganismos dirigido às <u>hi</u> fas mais frequentes do limo .....	20
3.2.3 - Hábitos vegetativos e reprodutivos das hi- fas mais frequentes do limo .....	21
3.2.4 - Classificação sistemática dos microrganis- mos isolados do limo .....	21
3.3 - <u>Fatores relacionados com a avaliação do crescimen-</u> <u>to de microrganismos em meio líquido de "água ser-</u> <u>vida"</u> .....	22
3.3.1 - Influência do período de incubação .....	22
3.3.2 - Influência da concentração de inóculo ....	23
3.4 - <u>Características do cultivo de microrganismos iso-</u> <u>lados do limo em meio líquido de "água servida" ..</u>	25
3.5 - <u>Efeito de agentes físicos e químicos no crescimen-</u> <u>to dos microrganismos "in vitro"</u> .....	26
3.5.1 - Influência da temperatura .....	27
3.5.2 - Influência de produtos químicos biocidas ou biostáticos .....	28
4 - RESULTADOS .....	30
4.1 - <u>Caracterização dos materiais limosos</u> .....	30
4.2 - <u>Natureza da flora microbiana dos materiais limo-</u> <u>sos</u> .....	30

	<u>Página</u>
4.2.1 - Isolamento de microrganismos por diluições em série .....	30
4.2.2 - Isolamento de microrganismos dirigido as hifas mais frequentes do limo .....	34
4.2.3 - Hábitos vegetativos e reprodutivos das hifas mais frequentes do limo .....	34
4.3 - <u>Fatores relacionados com a avaliação do crescimento de microrganismos, em meio líquido de "água servida"</u> .....	46
4.3.1 - Influência do período de incubação .....	46
4.3.2 - Influência da concentração do inóculo ....	46
4.4 - <u>Características do cultivo de microrganismos isolados do limo em meio líquido de "água servida".....</u>	48
4.5 - <u>Efeito de agentes físicos e químicos no crescimento dos microrganismos "in vitro"</u> .....	48
4.5.1 - Influência da temperatura .....	48
4.5.2 - Influência de produtos químicos biocidas ou biostáticos .....	58
5 - DISCUSSÃO .....	60
5.1 - <u>Natureza da flora microbiana .....</u>	60
5.2 - <u>Influência de agentes físicos e químicos no crescimento de microrganismos do limo .....</u>	68
6 - RESUMO E CONCLUSÕES.....	71
7 - SUMMARY .....	73
8 - BIBLIOGRAFIA CITADA.....	75
9 - APÊNDICE.....	80

## 1 - INTRODUÇÃO

A tecnologia da madeira tem aberto um campo de suma importância e inegável interesse à microbiologia. Considerando que a matéria prima básica, e muitos materiais empregados na fabricação da celulose, papel e outros produtos derivados da madeira, podem suprir as exigências nutricionais de microrganismos, tornou-se necessário estudar as funções que estas formas de vida podem desempenhar nessas indústrias. Se de um lado, podem ser obtidos alimentos através do crescimento microbiano a partir de resíduos industriais (HARRIS e cols., 1948a e 1948b; STRANKS, 1970), de outro, estes microrganismos podem causar sérios prejuízos quando se estabelecem nesses resíduos em recirculação nos sistemas industriais (DIEHM, 1969).

As instalações da Duratex S.A., Indústria e Comércio em Botucatu e Jundiaí, Estado de São Paulo, produtora de chapas de fibras da madeira de Eucalyptus, vem apresentando um problema de acumulações limosas nos sistemas de recirculação da "água servida". Essas acumulações caracterizam-se por sua consistência membranosa, viscosa ou limosa e leve odor sulfídrico. Ao atingirem certas proporções de crescimento, desprendem-se das estruturas de sustentação da máquina formadora do colchão, entram no sistema de recirculação da "água servida" ou caem diretamente sobre o colchão de polpa, provocando manchas depreciadoras da qualidade das chapas. Além dos prejuízos diretos à qualidade do produto, considerada de nível excelente no Mercado Internacional, devem ser somados os prejuízos da paralização periódica da indústria, para a eliminação das acumulações limosas.

A inegável importância econômica e científica do problema e sua natureza complexa e pouco conhecida, levaram à elaboração deste trabalho que, especificamente, visou estudar a natureza microbiológica dos materiais limosos encontrados nessas indústrias, e apresentar subsídios para seu controle.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As acumulações limosas, encontradas em indústrias de celulose e papel são comumente referidas na literatura (CASEY, 1960; DIEHM, 1969; EVELEIGH & BREWER, 1964a; e SANBORN, 1965), como acumulações devidas ao crescimento de microrganismos, aos produtos de seu metabolismo, fibras e vários compostos orgânicos e inorgânicos. SANBORN (1965), definiu os materiais limosos formados nessas indústrias por suas características iniciais gelatinosas e aderentes, membranosas, espessas, viscosas a pastosas ou gomosas, tornando-se, em estágios mais avançados, coriáceas e muito duras.

Na literatura consultada, não foram encontrados relatos sobre a ocorrência de acumulações limosas de origem microbiana, em indústrias de chapas de fibras da madeira. Por outro lado, muitos autores dedicaram-se ao estudo da natureza e controle da microflora de indústrias de celulose e papel (ALPER, 1960; BECKWITH, 1931; BREWER, 1958; CASEY, 1960; CONKEY & CARLSON, 1962 e 1963; COSTER, 1968; DELAPORTE & VLASSOF, 1960; DIEHM, 1969; EVELEIGH & BREWER, 1964a, 1964b e 1965; MARTIN, 1957; SANBORN, 1933/44/65; WANG, 1965; WOLFSON & MICHALSKI, 1964) e outros autores, dedicaram-se ao estudo da natureza e controle da microflora deterioradora da madeira e cavados empilhados (ASSARSON, 1969; GREAVES, 1971; KNUT, 1964; MERRIL & FRENCH, 1964 e 1966; SHIELDS, 1970; STRANKS, 1970; TANSEY, 1970).

Segundo SANBORN (1965), o início da formação de acumulações limosas, em indústrias de celulose e papel, deve-se aos nutrientes, provenientes da polpa e "água branca" (água recirculada na máquina formadora da folha de celulose), adsorvidos nas superfícies das máquinas. A própria água industrial, retirada dos rios, possui uma variedade de compostos orgânicos e inorgânicos (WATERS, 1957) que contribuem para complementar os requisitos nutricionais da microflora do limo (MARTIN, 1957).

A natureza da flora microbiana causadora do limo, nas indústrias de celulose e papel, depende do tipo de indústria, controles de operação, estações do ano, e características das matérias



primas não fibrosas adicionadas ao processo (DIEHM, 1969). Segundo TORGESSON (1967), muitos microrganismos diferentes têm sido encontrados nesses sistemas, isto é, bactérias, fungos, actinomicetos, algas e protozoários; a flora varia entre locais de uma mesma indústria na dependência dos nutrientes disponíveis, pH, temperatura, oxigenação, e do número de recirculações da "água branca". CASEY, (1960) aborda ainda os fatores que afetam o crescimento de microrganismos constituintes do limo dessas indústrias tais como: tempo de geração, ambiente químico, luz, aeração, umidade, temperatura, fontes de inóculo (água, fibras ou polpa, materiais não fibrosos ou aditivos industriais do processo), e o nível de contaminação dos sistemas industriais.

Dentre os grupos de microrganismos de maior importância, as bactérias têm sido apontadas como as principais responsáveis na formação dessas deposições limosas (Nason & cols., 1940, e Stracham, 1947, citados por EVELEIGH & BREWER, 1964a). Com efeito, as bactérias dos gêneros Achromobacter, Aerobacter, Alcaligenes, Arthrobacter, Bacillus, Brevibacterium, Chromobacterium, Clostridium, Escherichia, Flavobacterium, Paracolobacterium, Proteus e Pseudomonas têm sido, frequentemente, isoladas por vários autores (CONKEY & CARLSON, 1962 e 1963; BECKWITH, 1931; COSTER, 1968; DELAPORTE & VLASSOF, 1960; EVELEIGH & BREWER, 1964a; SANBORN, 1933, 1944 e 1965; WOLFSON & MICHALSKI, 1964) e, a formação de materiais capsulares, resultantes do metabolismo de alguns desses gêneros, têm sido enfocada como responsável pelo aspecto viscoso do limo das indústrias de celulose e papel (BECKWITH, 1931; CASEY, 1960; DELAPORTE & VLASSOF, 1960; e SANBORN, 1965).

Dentre os inúmeros gêneros de fungos saprófitas de sistemas industriais da fabricação de celulose e papel, WANG (1965) apresenta, minuciosamente, uma extensa relação de gêneros de Phycomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes, Deuteromycetes e alguns Actinomycetes, isolados a partir de amostras de várias indústrias dos Estados Unidos. Nessa relação são citados como infrequentes, as leveduras dos gêneros Trichosporon, Candida e Rhodotorula e, como frequentes, os gêneros Alternaria, Aspergillus, Penicillium, Clados-

porium, Geotrichum, Polyporus, Trichoderma, Fusarium, Hormodendron, Torula e outros Deuteromycetes em menor escala. As bactérias também foram isoladas por WANG (1965), mas não foram estudadas.

Por outro lado, EVELEIGH & BREWER (1964a), estudando a natureza da flora microbiana das acumulações limosas de indústrias de celulose e papel dos Estados Unidos, numa série de amostragens entre 1959 e 1961, verificaram uma flutuação acentuada na população e na predominância dos gêneros de fungos e bactérias isoladas. No decorrer das épocas de amostragem os gêneros Sporotrichum, Geotrichum, Phialophora e Trichosporon pullulans, foram os mais frequentes dentre os fungos, enquanto que os gêneros Pseudomonas, Flavobacter e Aerobacter foram os mais frequentes entre as bactérias. Além dos gêneros acima citados, EVELEIGH & BREWER (1964b e 1965), isolaram Nectria, Cephalosporium e Candida em menor frequência, bem como muitas outras leveduras não identificadas.

Os gêneros Aspergillus, Alternaria, Cladosporium, Chaetomium, Penicillium e Trichoderma, bem como Oidium, Monilia e outros fungos relacionados com as leveduras, foram relatados por SANBORN (1933, 1944 e 1965).

As observações de que os fungos são, aparentemente, de maior importância na formação das deposições limosas de indústrias de celulose e papel, foram feitas por EVELEIGH & BREWER (1964a), através do exame microscópico do limo. Desta forma, as características microscópicas denotaram um material composto, principalmente, por um emaranhado de fibras de celulose e hifas não esporulantes, associadas com pequena quantidade de bactérias e impurezas. Enfatizaram também a importância dos fungos, face às altas contagens de colônias obtidas nos isolamentos por diluições em série, a despeito de que muitas células das hifas deveriam morrer, durante os processos de homogeneização das amostras, uma vez que as colônias originaram-se de fragmentos de hifas com mais de quatro interseptos. Alertaram também que a dominância, na natureza da flora limosa, é dinâmica: em 1957 o gênero mais frequentemente isolado foi Phoma; de 1959 a 1961, este organismo praticamente não foi isolado enquanto que, Sporotrichum sp, Geotrichum candidum, Phialopho-

ra fastigiata e Trichosporon pullulans foram dominantes, conforme a época do isolamento."

A importância da interrelação entre microrganismos, em deposições limosas de indústrias de celulose e papel, foi abordada por EVELEIGH & BREWER (1964b) através de estudos sobre os requisitos nutricionais da flora microbiana do limo e posteriormente em 1965, pelo efeito de extratos de cultivo de alguns microrganismos no crescimento de outros. Os resultados desses estudos sugeriram uma interdependência de organismos deficientes para vitaminas com outros organismos do limo não deficientes e que deve ocorrer mecanismos de sinergismo que regulam o crescimento ou a predominância de certos gêneros na flora limosa, dependendo da época do ano, condições nutricionais e de outras condições ecológicas. Tais mecanismos de sinergismo e outros de antagonismo são discutidos de maneira mais ampla, para associações gerais entre microrganismos, por MARSHALL (1915) e POCHON & BARJAC (1958).

Para estudar a natureza da flora microbiana de indústrias de celulose e papel, de maneira geral, têm sido utilizados meios de cultura artificiais (Bacto malt. extract agar, EDA, Czapek Dox agar, e outros), no isolamento de microrganismos da polpa e papel (WANG, 1965) e de materiais limosos ocorrentes nesses indústrias (CONCKEY & CARLSON, 1963; COSTER, 1968), bem como, alguns meios seletivos para grupos de microrganismos como, por exemplo, o meio de POSTAGE (1963), utilizado por COSTER (1968) no isolamento de bactérias redutoras do sulfato, a partir de amostras limosas de Victoria e Tasmania. Por outro lado, EVELEIGH & BREWER (1964a e 1964b), utilizaram-se da adição de rose bengal a meios artificiais, com a finalidade de diminuir o crescimento de bactérias durante as operações de isolamento de microrganismos das acumulações limosas. EVELEIGH & BREWER (1964a), utilizaram, além dos meios artificiais, o meio natural de "água branca"-agar, o qual mostrou-se similar no tocante aos tipos de microrganismos isolados, exceto pelo maior número de bactérias.

O isolamento de microrganismos da microglora limosa, tem sido efetuado pelo método de diluições em série, conforme as

recomendações da Technical Association of Pulp and Paper Industry (1965) citadas e/ou utilizadas por vários autores (BREWER, 1958; EVELEIGH & BREWER, 1964a; WANG, 1965; WOLFSON & MICHALSKI, 1964)e, pelo método de plaqueamento em estrias (BECKWITH, 1931; e COSTER, 1968).

O principal objetivo de todos os pesquisadores, na tentativa de elucidar as causas do problema, é fornecer os subsídios para manter o crescimento da flora microbiana sob controle. Segundo CASEY (1960), a primeira medida importante é o controle preventivo através da inspeção periódica da indústria visando observar: 1) as fontes de inóculo, 2) os locais onde está ocorrendo crescimento excessivo, 3) recomendações para o controle, e 4) indicações sobre a eficiência de vários tratamentos. Sugere ainda, que sejam colhidas amostras dos vários locais de formação limosa das indústrias, bem como, da "água branca" e ainda dos aditivos inerentes ao processo, para a determinação da população de microrganismos. A segunda medida é a limpeza dos sistemas industriais e o uso subsequente de desinfetantes, constituindo-se no passo mais importante antes de qualquer tipo ou programa de controle.

Na literatura consultada, foram encontradas duas opções de controle à microflora de indústrias de celulose e papel : elevação da temperatura (aquecimento) e utilização de agentes biocidas ou biostáticos.

O efeito da temperatura no crescimento de microrganismos foi abordado de maneira ampla por COCHRANE (1958) e, mais especificamente, em relação a flora microbiana do limo por CASEY (1960) e EVELEIGH & BREWER (1964a e 1964b). Algumas espécies de leveduras psicrófilas (Trichosporon pullulans, Candida spp e Torulopsis inconspicua) foram isoladas por EVELEIGH & BREWER (1964a) com crescimento ótimo a 20°C, e inibição a partir de 25°C.

A água quente e o vapor têm sido largamente utilizados nas operações de limpeza dos sistemas industriais de celulose e papel (CASEY, 1960). Segundo esse mesmo autor, a água quente tem se mostrado mais eficiente que o vapor, pelo fato de entrar em conta-

to com todo o sistema por um período mais longo. Por outro lado, a resistência de microrganismos à temperatura e toxicantes tem sido enfatizada por vários autores. Em geral, as bactérias não esporulantes são completamente destruídas ao contrário das esporulantes (Appling, 1945, citado por CASEY, 1960). Sob outro aspecto, a morte ou inibição de um grupo de microrganismos pode redundar no crescimento de outros que eram inibidos pelos primeiros (CASEY, 1960). Segundo este último autor, os fungos Aspergillus flavus-oryzae, Cladosporium, Penicillium e Monilia são mais difíceis de controlar que Oidium, Spicaria e Trichoderma. Dentre as bactérias, Bacillus subtilis, Actinomyces e Aerobacter cloacae são de controle mais difícil que Achromobacter, Aerobacter aerogenes e Escherichia coli. Entretanto, UNLIGIL (1968) relata as espécies de Trichoderma viride, Gliocladium viride, Cephaloascus fragans e Pullularia pullulans, como organismos tolerantes ao pentaclorofenol.

A opção de controle normalmente utilizada pelas indústrias de celulose e papel, tem sido o uso de agentes químicos - na inibição do crescimento microbiano. Os produtos normalmente utilizados no controle à flora limosa, são comumente referidos como "slimicidas". Os mecanismos de ação de toxicantes biostáticos e/ou biocidas são amplamente abordados por TORGESSON (1967) e, segundo CASEY (1960), os "slimicidas" podem agir por duas vias: interferindo em funções metabólicas específicas do microrganismo ou, reagindo com as proteínas citoplasmáticas causando a inativação das células.

A escolha do biocida industrial adequado a um determinado uso requer conhecimento de condições fundamentais como: o tipo de microrganismo predominante no ambiente, o nível de eliminação microbiana requerido, o emprego de tratamento periódico ou contínuo, pH, temperatura, presença de emulsificantes, matéria orgânica, potencial de inóculo, espectro de ação, estabilidade e poder residual do produto, dosagem inibitória e letal, preço, corrosão e suas implicações na poluição das águas com esgotos industriais (ALPER, 1960; BENIGNUS, 1948; CASEY, 1960; HACKETT, 1967 e 1968; HILL, 1971; LAGARDE, 1961; MARSH e cols., 1944; ROSS, 1963; SCHMITZ e

cols., 1930; SHAPIRO, 1958; TORGESSION, 1967; WESSEL & BEJUKI, 1959).

Dentre os principais toxicantes utilizados nas indústrias de celulose e papel, CASEY (1960), discute os efeitos da cloração, cloraminas, fenóis clorinados, compostos organo-mercuriais, e alguns outros germicidas. CONKEY & CARLSON (1963) apresentam uma extensa lista com a toxicidade relativa de agentes biostáticos, sugeridos para a utilização em indústrias de celulose e papel. O método para testar os toxicantes foi o de placas de Petri, contendo meio artificial (Bacto-malt Extract-Agar), ao qual adicionaram concentrações conhecidas de um grande número de produtos, frente às bactérias do gênero Aerobacter e Bacillus e, aos fungos Aspergillus e Penicillium.

Um dos problemas encontrados na escolha dos agentes biocidas ou biostáticos, é o método para comparar a eficiência relativa dos mesmos. A avaliação pode ser realizada na própria indústria, através de um método citado por CASEY (1960), que consiste no peso seco do material limoso, em g, acumulado em chapas de plástico de área conhecida, mergulhadas no sistema de recirculação da "água branca", e, os resultados são expressos em g/unidade de área. A maioria dos métodos, entretanto, consiste na utilização de técnicas de laboratório, ou seja, no teste "in vitro" das propriedades biocidas ou biostáticas dos produtos.

Vários autores, como CASEY (1960), CONKEY & CARLSON (1962) e COSTER (1968), discutem as vantagens e desvantagens da utilização de diferentes métodos "in vitro", cujos fundamentos foram sintetizados por COSTER (1968), conforme a Tabela 1, adaptada e transcrita neste revisão. CONKEY & CARLSON (1962), observaram correlações de 47 a 77% entre 3 métodos utilizados para testar a eficiência de toxicantes "in vitro": incorporação dos toxicantes a placas de Petri contendo meio artificial, inoculadas com o microrganismo teste; incorporação de toxicantes e culturas puras de microrganismos a meio líquido de polpa desintegrada - "spore-pulp-method" incubado sob agitação constante; incorporação de toxicantes e popu

Tabela 1: Análise das técnicas utilizadas para testar as propriedades biocidas ou biostáticas de toxicantes (adaptado de COSTER, 1968).

MEIO TESTE	MÉTODO DE ADIÇÃO DO TOXICANTE	INÓCULO	TEMPO DE CONTATO	AVALIÇÃO DOS RESULTADOS
Agar + nutrientes	Ao meio teste	Culturas puras conhecidas	Durante o período de incubação	Visual (Appling & McCoy, 1945; Shera, e cols, 1949; CONKEY & CARLSON, 1962).
Agar + nutrientes	Em discos colocados no centro das placas	Culturas puras conhecidas	Durante o período de incubação	Medida das zonas de inibição (Shema e cols, 1949; CASEY, 1960)
Meio sintético líquido	Ao meio teste em tubos de ensaio	Culturas puras conhecidas	Durante o período de incubação	Leituras turbidimétricas (Cohen & Kaln, 1952)
Água industrial ou "água branca" + fibras	A "água branca" em frascos, sob agitação	População natural do limo homogenizado	Durante o período de incubação (48 horas)	Peso seco do material limoso formado. Número de microrganismos vivos após o período de incubação (Stern, 1959; CASEY, 1960; CONKEY & CARLSON, 1962).
"Água branca + 30% de fibras	A "água branca" em frascos	Microrganismos presentes na água	1 a 24 horas	Contagem do plaqueamento (King, 1944; Herschler, 1953)
Água destilada + 2,5% de polpa desintegrada	Ao meio líquido em frascos, sob agitação	Culturas puras conhecidas	2 horas	Contagem do plaqueamento para estimar a % de morte (Appling e cols, 1951; CONKEY & CARLSON, 1962)
"Água branca" circulando num aparato especial para coletar as deposições limosas	A "água branca" de composição conhecida	Culturas puras ou mistas	1, 2, 3 dias	Visual do material limoso formado e contagem de placas (Michalski e cols, 1963).
"Back water" da máquina sob investigação, incubada num aparato especial	A "backwater"	População natural	Acima de 6 horas	Contagem de bactérias nos tubos (Crawshaw, 1964).

lações naturais da microflora do limo, a meio líquido de "água branca", incubado sob agitação constante. Segundo esses autores, o último método mostrou-se desejável para comparar ou recomendar a utilização de toxicantes em situações específicas de cada indústria.

Segundo COSTER (1968), nenhum dos métodos analisados na tabela 1, satisfaz totalmente os seguintes critérios: 1) o substrato deve ser invariável e os inóculos devem ser constituídos de culturas puras e conhecidas; 2) as condições do teste devem assemelhar-se ao máximo às condições da indústria (aeração, pH, composição do meio e temperatura); 3) deve possibilitar fácil visualização dos efeitos potenciais dos toxicantes e fornecer uma boa superfície de crescimento aos microrganismos; 4) a técnica deve permitir o teste de um grande número de tratamentos. Em vista deste fato, COSTER (1968), idealizou um método "in vitro" para testar as propriedades biocidas e biostáticas de toxicantes que, em linhas gerais, consiste num aparato rotatório (1 revolução/minuto) no qual os tubos de ensaio ficam em posição próxima à horizontal e, o meio teste é a "água branca, artificialmente preparada, conforme fórmula de Michalski e cols (1963), citados por COSTER (1968).

As técnicas empregadas nos isolamentos de microrganismos e nos testes das propriedades biocidas ou biostáticas de toxicantes, ainda que relatadas nos estudos da natureza e controle da flora microbiana das acumulações limosas de indústrias de celulose e papel, serviram como ponto de partida para o presente estudo, onde a matéria prima fundamental é a polpa da madeira, e alguns passos do processo de industrialização de chapas de fibras da madeira, como por exemplo, os sistemas de recirculação da "água servida" e formação do colchão de polpa, são muito semelhantes aos das indústrias de celulose e papel.



### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

A natureza da flora microbiana, das acumulações limosas encontradas em indústrias de chapas de fibras de madeira, foi estudada levando-se em consideração a frequência de estruturas de microrganismos presentes nos materiais limosos, o isolamento de microrganismos em cultura pura, e o cultivo desses microrganismos em meio natural de "água servida", visando reproduzir as principais características dos materiais limosos "in natura".

As amostras limosas foram coletadas nas instalações da Duratex S.A. Indústria e Comércio, em Botucatu, em diferentes pontos de ocorrência do limo relacionados ao sistema de recirculação da "água-servida" e formação do colchão de polpa (Figuras 1 e 2), no período compreendido entre maio de 1974 a setembro de 1975. O pentaclorofenol, na dosagem de 25 p.p.m., vem sendo incorporado ao sistema de recirculação da "água servida".

As amostras foram coletadas e acondicionadas em frascos esterilizados de 250 ml, com o auxílio de um aparato em aço inoxidável, idealizado para retirar o limo em locais de difícil acesso e drenar o excesso de água das amostras (Figura 3). Antes da coleta de cada amostra, o aparato foi lavado e flambado.

A coleta das amostras condicionou-se ao estágio em que as acumulações limosas atingiam um crescimento capaz de causar problemas à indústria, fato que geralmente ocorria a partir do 10º dia após as limpezas periódicas da máquina formadora do colchão.

#### 3.1. Caracterização dos materiais limosos

Com a finalidade de caracterizar o material em estudo, as amostras de limo foram analisadas macro e microscopicamente, da maneira que se segue:

LOCAIS DE AMOSTRAGEM:

- P12 Canaletas de coleta da água de lavagem das telas
- P13 - Sustentações verticais da máquina formadora do colchão
- P14 Sustentações horizontais da mesma máquina
- P15 Paredes da canaleta de escoamento da água da "formadora" para o tanque de "água servida"
- P17 - Paredes do tanque de "água servida"
- P18 - Tanque de "água servida"
- P19 - Canaleta de coleta de água de lavagem da tela superior

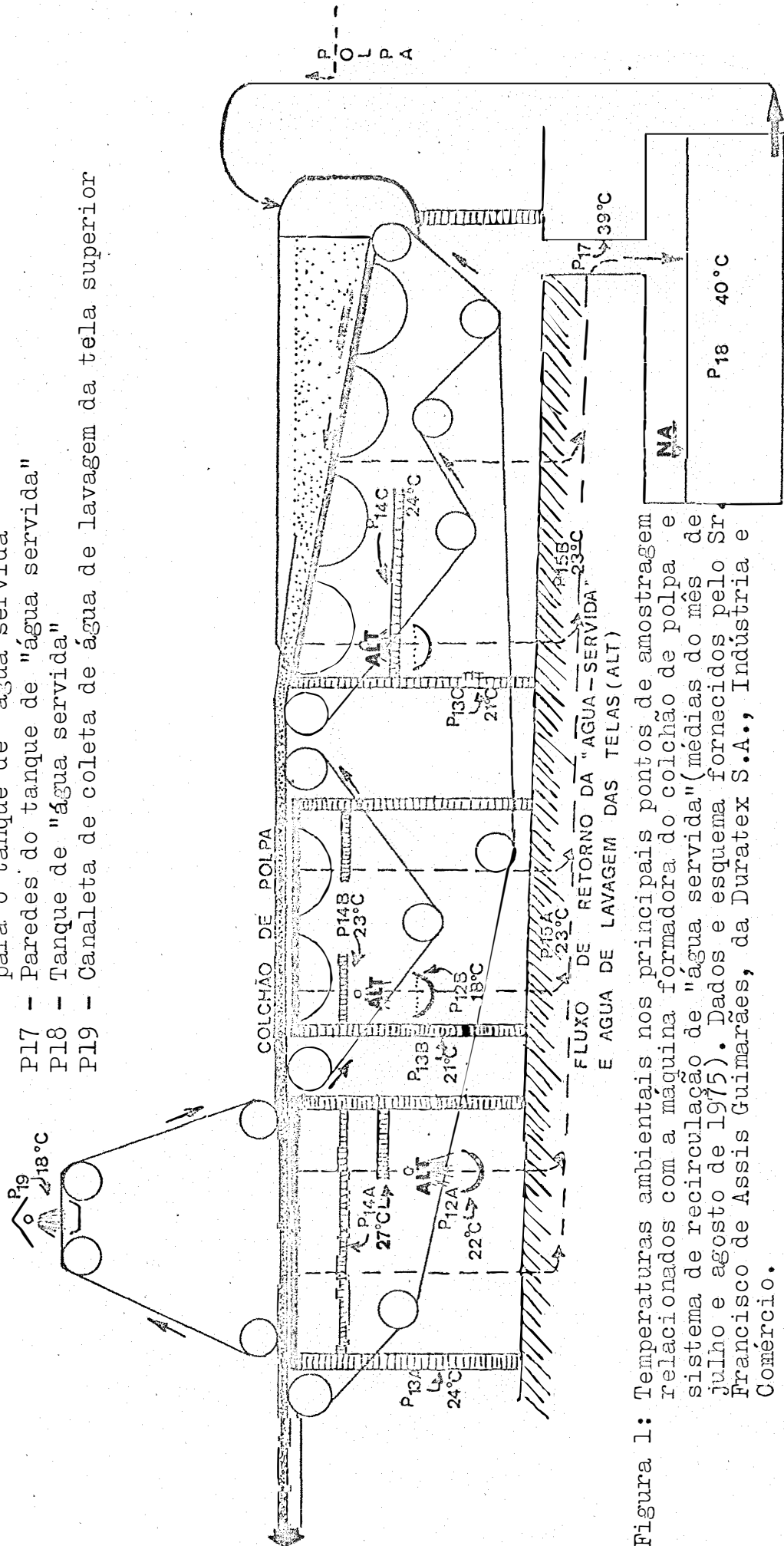


Figura 1: Temperaturas ambientais nos principais pontos de amostragem relacionados com a máquina formadora do colchão de polpa e sistema de recirculação de "água servida" (médias do mês de julho e agosto de 1975). Dados e esquema fornecidos pelo Sr. Francisco de Assis Guimarães, da Duratex S.A., Indústria e Comércio.

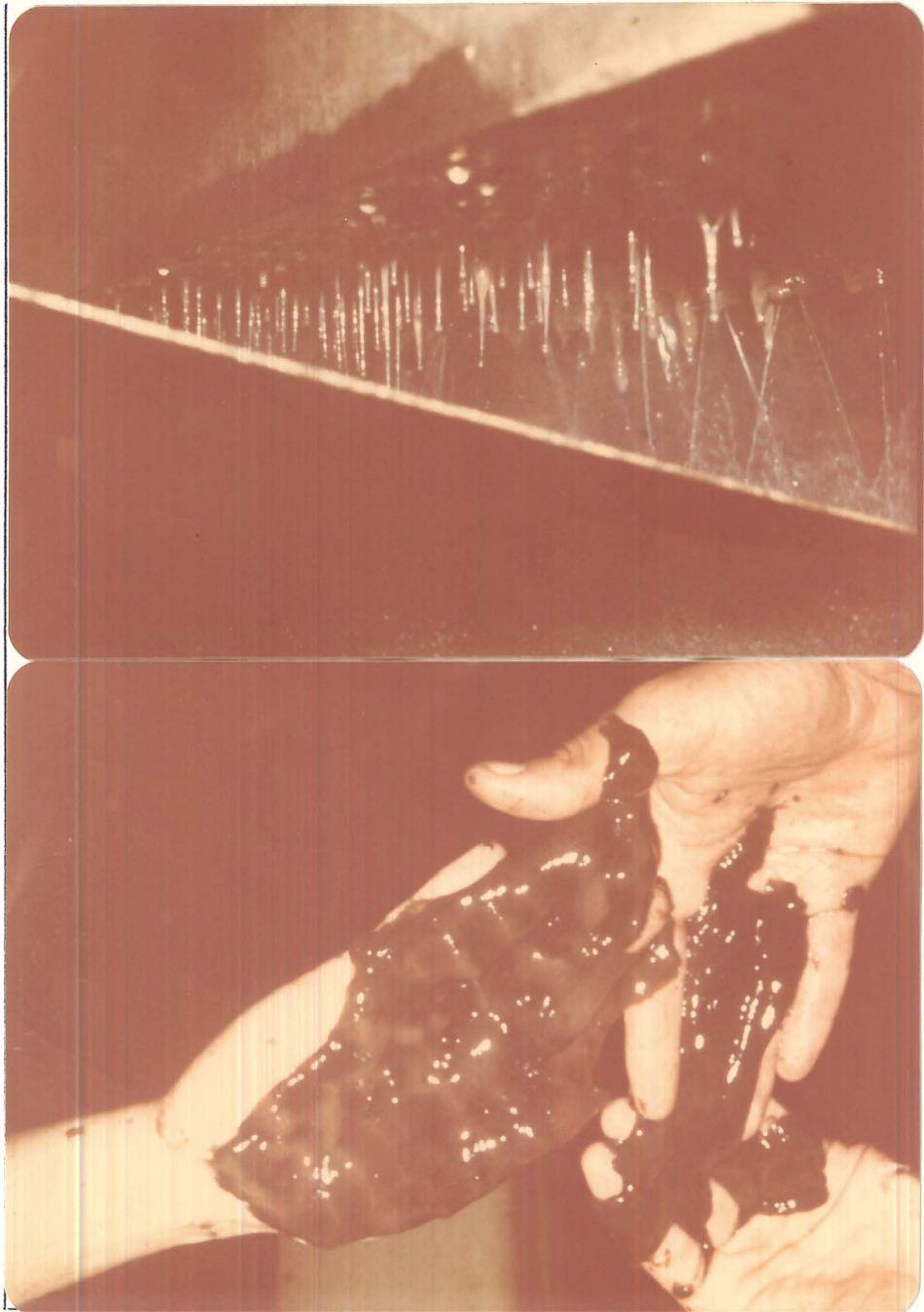


Figura 2: Aspectos do problema de acumulações limosas em indústrias de chapas de fibras de madeira: acima, limo de tonalidade clara, encontrado nas sustentações horizontais da máquina formadora do colchão de polpa (P14B); abaixo, limo de tonalidade intermediária e escura, encontrado nas paredes da canaleta de cimento da máquina formadora (P15B).

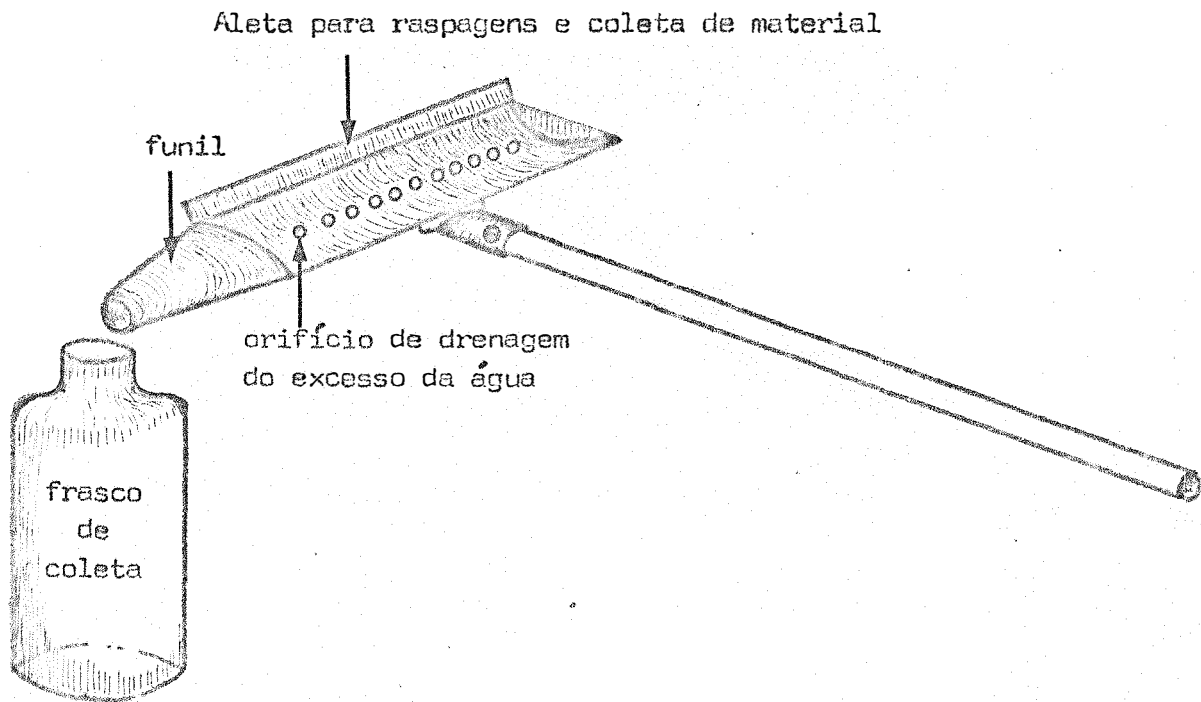


Figura 3: Esquema do aparato de aço inoxidável utilizado para coleta do material limoso.

### 3.1.1. Caracterização macroscópica

As amostras de limo, de cada ponto de coleta, foram subdivididas quanto à tonalidade em limo claro, intermediário e escuro, de acordo com padrões previamente estabelecidos em mostruários e cuja avaliação quantitativa foi medida através do volume. Foram coletadas amostragens ao 10º e 16º dia (23/07/75 e 29/07/75, respectivamente), após uma das limpezas periódicas da máquina formadora do colchão de polpa e do sistema de recirculação da "água servida".

### 3.1.2 - Caracterização microscópica

Após a caracterização macroscópica, foram preparadas lâminas, em lactofenol, de pequena porção de material limoso claro, intermediário e escuro, dos diferentes locais e épocas de amostragem, avaliando-se a ocorrência e frequência de estruturas microscópicas, selecionadas após várias observações e dados preliminares, descritas a seguir e ilustradas na Figura 4:

A - Hifas de  $5,5-10,6 \mu$  ( $\hat{m} = 7,8 \mu$ ) de espessura, hialinas, cilíndricas, septos evidentes em relêvo ( $7,3$  a  $12,8 \mu$  ( $\hat{m} = 8,9 \mu$ ), distando entre si de  $41,2 \mu$  a  $125,4 \mu$  ( $\hat{m} = 68,4 \mu$ ), com ramificações laterais de espessura média (Característica C), geralmente unidirecionadas e à base dos septos;

B - Hifas de  $6,9-13,8 \mu$  ( $\hat{m} = 10,2 \mu$ ) de espessura, sub-hialinas, septadas, com distância entre septos variando de  $55,0$  a  $154,2 \mu$  ( $\hat{m} = 75,3 \mu$ );

C - Hifas de  $3,6$  a  $5,4 \mu$  ( $\hat{m} = 4,4 \mu$ ) de espessura, hialinas, cilíndricas (semelhantes às descritas em A), septos evidentes em relêvo ( $5,4$  a  $7,3 \mu$ ,  $\hat{m} = 6,2 \mu$ ), distando entre si de  $21,8-145,4 \mu$  ( $\hat{m} = 58,9 \mu$ );

D - Hifas de  $1,8$  a  $2,9 \mu$  ( $\hat{m} = 2,5 \mu$ ) de espessura, hialinas, cilíndricas, com distância entre septos variando entre  $36,4$  a  $181,8 \mu$  ( $\hat{m} = 77,8 \mu$ );

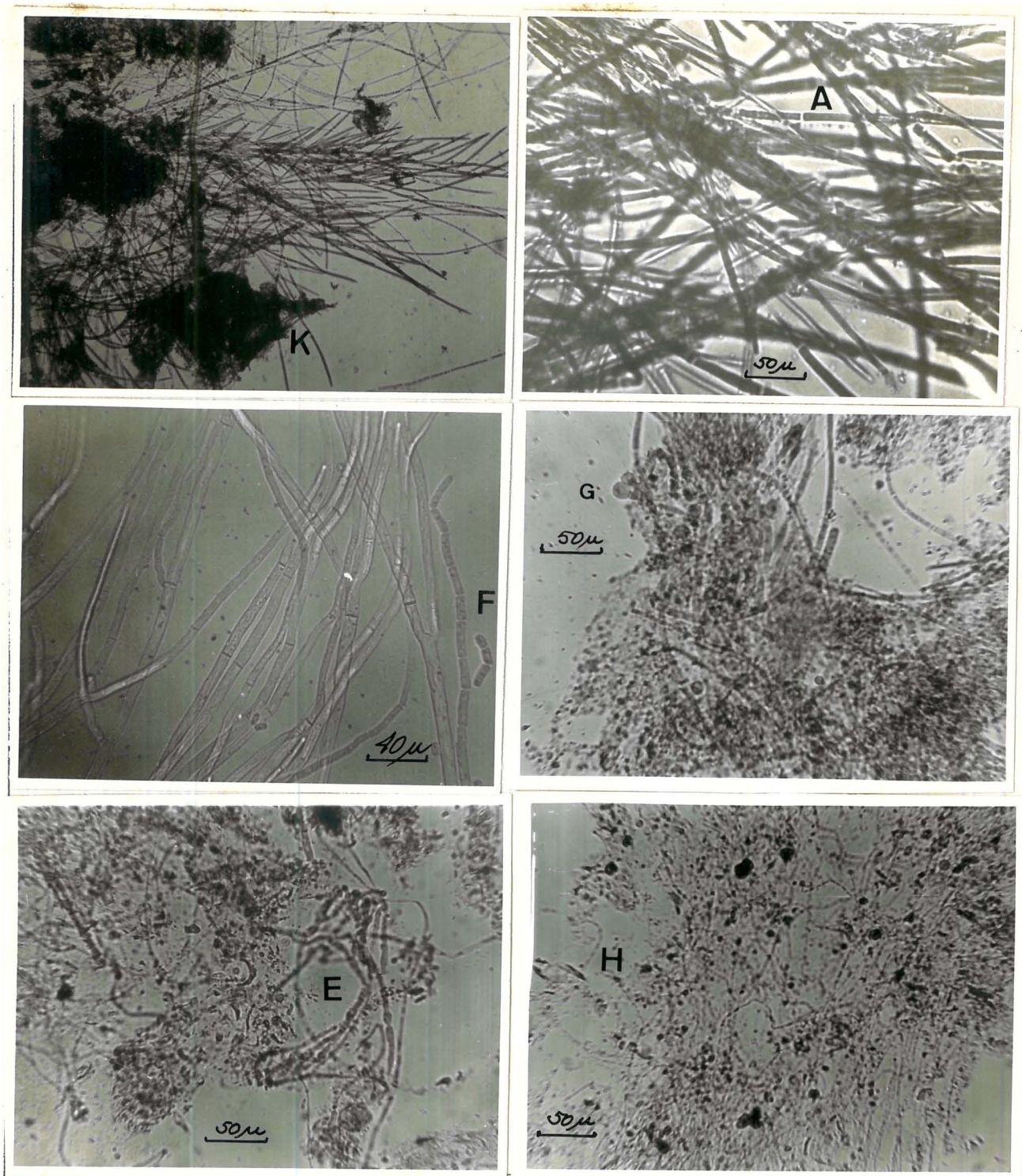


Figura 4: Características microscópicas encontradas em acumulações limosas de indústrias de chapas de fibras da madeira. Da esquerda à direita e de cima para baixo: aspecto geral hifálico e presença de impurezas (K); hifas de 5,5 a 10,6  $\mu$  de espessura com septos em relêvo (A); as mesmas hifas acima, reproduzindo-se pela formação de artrosporos (F); formação de clamidosporos (G); hifas de perfil irregular (E); bacilos formando cadeias (H).

E - Pseudo-hifas hialinas, com constrictões regulares (em forma de colar) ou irregulares, relacionadas ao pseudomicélio de leveduras e, outras hifas hialinas ou levemente coloridas, com perfil irregular, de espessura variando entre 4,2 e 6,8  $\mu$  ( $\hat{m} = 5,5 \mu$ ) e distância entre septos de 8,2 a 13,7  $\mu$  ( $\hat{m} = 10,7 \mu$ );

F - Hifas caracterizadas em A, B, C, D e E, apresentando esporulações por gemulação (blastosporos), e fissão transversa terminal ou intercalar (artrosporos), ou outros esporos;

G - Clamidosporos terminais ou intercalares - estruturas de paredes duplas, medindo 3,6 a 10,9  $\mu$  de diâmetro ( $\hat{m} = 6,9 \mu$ );

H - Bactérias (bacilos) unidas em longas cadeias;

I - Bactérias (bacilos) em aglomerados mucilaginosos;

J - Leveduras em aglomerados mucilaginosos;

K - Impurezas - presença de células ou tecidos parenquimatosos, fibras, meias fibras, casca da madeira, cristais e outros resíduos industriais de aditivos inerentes ao processo.

As características A a E indicaram a ocorrência dos diferentes tipos de hifas nos materiais limosos e foram avaliados pelo número de estruturas presentes em 5 campos microscópicos (casualizados em relação ao material da lâmina), em cada uma das 3 repetições. Para obter-se uma idéia relativa de importância, a contagem - foi transformada em porcentagem, relativamente ao número total dessas características.

As características F e G indicaram a frequência de esporulação dos diferentes tipos de hifas no limo. Desta forma, essas contagens foram transformadas em porcentagem relativamente ao número total das características A a E.

As características H a J mediram a importância das bactérias e leveduras na formação de mucilagens sendo que, H foi avaliada pelo número, e as características I e J foram avaliadas pela área (em  $\text{cm}^2$ ), transformada em porcentagem em relação a área total do campo microscópico ( $70,85 \text{ cm}^2$ ), projetada pela câmara lúcida.

A característica K mediu as impurezas dos materiais limosos e foi avaliada pelo mesmo critério, citado acima, utilizado nas características I e J.

Para a avaliação quantitativa dessas estruturas microscópicas utilizou-se uma câmara lúcida, cuja imagem projetada foi tracejada em papel fosco, utilizando-se cores diferentes para cada estrutura. Os desenhos das áreas ocupadas pelas características I, J e K foram medidos através de planímetro.

Os dados da caracterização do limo, não foram submetidos à análise estatística.

### 3.2. Natureza da flora microbiana dos materiais limosos

Para o isolamento de microrganismos em cultura pura, as amostras de materiais limosos foram fracionadas em limo claro, intermediário e escuro (conforme os métodos descritos anteriormente) e processadas da maneira que se segue:

#### 3.2.1. Isolamento de microrganismos por diluições em série

Os isolamentos de microrganismos por diluições em série visaram avaliar, quantitativa e qualitativamente, a natureza da flora microbiana do limo.

##### 3.2.1.1 - Análise da população microbiana

Amostras compostas de cada tonalidade de limo, provenientes dos pontos P14B, P14C e P15B (coletadas em 15/06/74, 30/07/74 e 04/11/74), foram homogeneizadas em liquidificador por 30 segundos. A seguir, 30 ml dos materiais foram diluídos em 270 ml de água estéril, dando início ao método convencional de diluições em série (JOHNSON e cols, 1959), com plaqueamento das diluições  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  e  $10^{-8}$ , em meio de "água servida" - agar. A "água servida" é a água



recirculada no sistema de formação do colchão de polpa, para proporcionar uma diluição adequada das fibras da madeira e, por este fato, constituiu-se num extrato de madeira de pH = 3,6 e cerca de 1% de carbohidratos totais. Para evitar a hidrólise do agar na confecção dos meios sólidos, devido ao seu alto grau de acidez, a "água servida" foi filtrada em velas porosas de gesso, que a tornavam límpida e com pH em torno de 5,5. Após a autoclavagem o pH foi corrigido, ao seu valor inicial, com solução saturada de sulfato de alumínio, a 50°C.

Após o plaqueamento das diluições em série, as placas foram incubadas a 27°C, durante 3 dias e, finalmente procedeu-se à contagem do número de colônias.

#### 3.2.1.2 - Amostragem de colônias

A partir do isolamento de microrganismos por diluições em série, da amostragem de 04/11/74, foram repicadas ao acaso 10% das colônias ocorrentes nas menores diluições (placas contendo entre 100 e 300 colônias), e a totalidade de colônias ocorrentes nas maiores diluições (placas contendo entre 1 e 30 colônias). Essas colônias foram transferidas em meio líquido de extrato de malte e levedura (segundo Wickerham, 1951, citado por LODDER, 1970), com pH a 3,6 e incubados a 27°C durante 4 dias. Após a incubação procedeu-se à purificação das culturas, mediante o plaqueamento de 0,1 ml da suspensão, em meio com a mesma constituição acima, acrescido de 13g de agar em pó Merck, e com pH corrigido a 3,6 após a autoclavagem. As culturas puras foram repicadas para tubos com meio inclinado de malte-extrato de levedura-glucose-agar, de composição descrita por LODDER (1970).

Após a purificação, as culturas foram agrupadas macroscopicamente em tipos culturais, utilizando-se placas contendo meio de malte-extrato de levedura-glucose-agar, inoculadas ao centro. As características macroscópicas utilizadas para os agrupamentos culturais foram: perfil da colônia (protuberante, ondulado, côncavo ou convexo); bordos (lisos, lobados, ondulados, filamentosos ou

rizoides); aspecto (viscoso, úmido, seco, filamentosos, aveludado, cotonoso, pulverulento ou leitoso); superfície (lisa, rugosa ou rendilhada); brilho (translúcido, brilhante, ceroso ou opaco); e coloração.

Os tipos culturais, obtidos nos agrupamentos macroscópicos, foram conservados na micoteca em frascos hermeticamente fechados, contendo meio de "água servida"-agar, após prévia incubação a 27°C durante 6 dias. Paralelamente, os tipos culturais foram mantidos em tubos com meio inclinado de "água servida"-agar, para posterior utilização nos ensaios envolvendo o cultivo de microrganismos, em meio líquido de "água servida" e biotestes.

### 3.2.2. Isolamento de microrganismos dirigido às hifas mais frequentes do limo

A partir de materiais limosos, coletados na amostragem de 29/07/75, nos pontos Pl4B e Pl5A, foi efetuada uma seleção inicial dos materiais de coloração clara e intermediária. A seguir, os materiais foram lavados 5 vezes em água esterilizada, com o auxílio de um agitador magnético, com a finalidade de provocar o desmembramento da trama miceliana e livrá-la de esporos, células de levedura, talos bacterianos e impurezas. Amostras desses materiais foram espalhadas, com o auxílio de uma espátula de Drigausky, em meio de agar-água.

Sob o microscópio e com auxílio de técnicas de micromanipulação, coletou-se fragmentos de hifas espessas (característica microscópica A), as quais foram repicadas para tubos contendo meio inclinado de "água-servida"-agar, enriquecido com 0,1% de extrato de levedura.

Após a purificação, as características culturais dos microrganismos isolados, foram confrontadas com os tipos culturais obtidos nos isolamentos por diluições em série, utilizando-se a mesma metodologia descrita no item 3.2.1.2.

### 3.2.3. Hábitos vegetativos e reprodutivos das hifas mais frequentes do limo

Utilizando-se a mesma metodologia descrita para o item anterior (3.2.2), com o auxílio de técnicas de micromanipulação, fragmentos de hifas espessas do limo "in natura", de coloração clara, foram semeadas em lâminas escavadas, contendo uma gota de "água servida" filtrada e esterilizada, coberta com uma lamínula fixada à lâmina através de pontos de silicone, para permitir aeração. Este conjunto foi incubado a 27°C, no interior de placas de Petri, com umidade saturada.

Com a mesma metodologia, estudou-se os hábitos vegetativos e reprodutivos de Trichosporon cutaneun (de Beurm., Gougerot et Vaucher) Ota (T46) obtido através de isolamento dirigido às hifas espessas do limo, acima referidas.

### 3.2.4. Classificação sistemática dos microrganismos isolados do limo

Para estudar as características microscópicas dos microrganismos isolados do limo, foram efetuadas microculturas em meio de BDA (extrato aquoso de batata, 200 g; dextrose, 20 g; agar Merck, 13 g; e água destilada, q.s.p. 1.000 ml), segundo técnica de TASCHDJAN (1954) ligeiramente modificada.

Na classificação dos fungos, excluindo-se o grupo das leveduras, foram utilizadas as características culturais e microscópicas citadas nos padrões sistemáticos de vários autores (ALEXOPOULOS, 1966; BARNET, 1960; LACAZ e cols., 1970; SILVEIRA, 1968; WANG, 1965).

As leveduras foram classificadas segundo LODDER, (1970) de acordo com padrões culturais, microscópicos e fisiológicos. As características fisiológicas estudadas, basearam-se na habilidade dos microrganismos em: formar película em meios líquidos; fermentar a glucose, sacarose, galactose, maltose, trehalose, rafi-

nose, lactose e inulina; assimilar a glucose, sacarose, sorbose, galactose, maltose, trehalose, lactose, melibiose, rafinose, melezitose, inulina, amido solúvel, xilose, L-arabinose, D-arabinose, ribose, rhamose, etanol, glicerol, manitol, M-D-glucosídio, salicina, ácido láctico, succínico, cítrico e inositol; assimilar nitratos e nitratos; produzir ester; e, crescer em meios com 50 e 60% de glucose. Todos os materiais e métodos utilizados na elaboração dos testes, acima referidos, estão contidos em LODDER (1970).

As bactérias não foram classificadas no presente trabalho.

### 3.3. Fatores relacionados com a avaliação do crescimento de microrganismos, em meio líquido de "água servida".

Todos os ensaios envolvendo o cultivo de microrganismos isolados do limo, ou de populações naturais em meio líquido de "água servida", foram efetuadas mediante a inoculação em frascos contendo 150 ml de "água servida", filtrada em cilindros de 2" (contendo 20 cm de areia de quartzo) e, esterilizada a 1 atmosfera por 15 minutos. A incubação procedeu-se em agitadores horizontais com temperatura controlada a 27°C, sob agitação constante de 100 ciclos por minuto.

Preliminarmente, foram instalados dois ensaios para determinar o período de incubação e o efeito da concentração do inóculo na avaliação do crescimento de microrganismos em meio líquido de "água servida", conforme se segue:

#### 3.3.1 - Influência do período de incubação

Empregou-se a metodologia de incubação descrita no item 3.3 sendo que, a "água servida", foi enriquecida ou não (metade dos tratamentos) com glucose a 0,5%, autoclavada separadamente. Nos substratos, assim constituídos foram utilizados os seguintes inóculos:

- T44 (Trichosporon pullulans (Lindner) Diddens et Lodder), microrganismo isolado das deposições limosas, crescendo em meio de "água-servida"-agar, inoculado através de blocos de cultura de aproximadamente  $2 \text{ mm}^2$  de superfície;

- Limo claro lavado (LC1) conforme método descrito no item 3.2.2, do qual inoculou-se um volume de hifas suficiente para formar uma gota na alça de platina;

- Limo intermediário lavado (LII), constituído da mesma forma que o LC1;

- Limo escuro lavado (LE1) constituído da mesma forma que o LC1.

As avaliações do crescimento de T. pullulans e das populações naturais foram efetuadas no 1º, 4º, 7º e 14º dias de incubação, através do peso seco do material retido em papel filtro Whatman nº 1, previamente tarado.

Adotou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado, com 3 repetições. O efeito da testemunha (sem inóculo) não foi levado em conta na análise estatística, servindo apenas para correção do peso seco de sólidos insolúveis da "água servida" nos tratamentos inoculados.

### 3.3.2 - Influência da concentração do inóculo

Com base nos princípios que regem o crescimento de microrganismos e, devido à dificuldade de padronização do potencial de inóculo para todos os tipos culturais de microrganismos isolados do limo, aventou-se a hipótese de que as variações do potencial de inóculo, decorrentes do método de inoculação por blocos de cultura ( $2 \text{ mm}^2$ ), não aumentariam o erro experimental na avaliação (peso seco) do crescimento dos microrganismos, em meio líquido de "água servida".

Desta forma, instalou-se um ensaio empregando a metodologia de incubação descrita no item 3.3, bem como as concentrações

de inóculo dos microrganismos, relacionados a seguir:

Tipos cultu rais	Microrganismos	CONCENTRAÇÕES DE INÓCULO		
		esporos/ml		
T11	<u>Trichoderma viride</u> Pers	$3,6 \times 10^6$ *	$3,6 \times 10^3$	3,6
T92	<u>Penicillium</u> sp	$8,4 \times 10^6$	$8,4 \times 10^3$	8,4
T46	<u>Trichosporon cutaneum</u> (de Beurm., Gougerot et Vaucher) Ota	$64,0 \times 10^6$	$64,0 \times 10^3$	64,0
T43	<u>Aspergillus niger</u> van Tiegh	$142,0 \times 10^6$	$142,0 \times 10^3$	142,0

(\*) Dados médios da contagem de esporos em 20 campos microscópicos ao acaso.

A inoculação por suspensão de esporos foi efetuada através da transferência de 1 ml, de cada uma das 3 concentrações, para os frascos de "água servida".

Adotou-se um delineamento experimental inteiramente ao acaso com 3 repetições. O efeito da testemunha (sem inóculo) não foi levado em conta na análise estatística, pelo mesmo motivo apontado no ensaio anterior (item 3.3.1).

O período de incubação foi de 7 dias, com base nos resultados do ensaio anterior.

Nos ensaios envolvendo o cultivo de microrganismos, em meio líquido de "água servida", foi utilizado o método de inoculação por blocos de cultura. Por este motivo, estudou-se as variações da concentração de esporos numa série de blocos de cultura, de dimensões aproximadamente iguais, retirados ao acaso de culturas de T. viride (T11), Penicillium sp (T92), T. cutaneum (T46) e A. niger (T43) e, as contagens são apresentadas a seguir, no intuito de caracterizar as limitações do método.

Blocos de Cultura	M I C R O R G A N I S M O S			
	<u>T.viride</u> (T11)	<u>Penicillium sp</u> (T92)	<u>T.cutaneum</u> (T46)	<u>A. niger</u> (T43)
I	96,0*	200,0	115,2	196,8
II	96,0	240,0	147,6	310,8
III	268,8	280,0	174,2	336,0
IV	288,0	360,0	204,0	348,0
V	345,6	400,0	204,0	512,0
VI	422,4	440,0	224,0	592,8
VII	480,0	640,0	234,6	630,8
VIII	499,2	760,0	239,4	833,0
IX	691,2	840,0	265,6	1050,0
	768,0	920,0	278,4	1139,0
MÉDIA	395,5	508,0	208,7	594,2

(\*) número de esporos x  $10^3$  (contagem média de 20 campos microscópicos ao acaso)

#### 3.4. Características do cultivo de microrganismos isolados do limo, em meio líquido de "água servida"

Devido à dificuldade de testar em conjunto, a totalidade dos tipos culturais de microrganismos isolados do limo, o estudo das características macro e microscópicas do crescimento desses microrganismos, em meio líquido de "água servida", foi conduzido preliminarmente em 3 séries de testes. Na primeira série, foram testados os tipos culturais T1 a T56; na segunda, T57 a T119; e, na terceira, T120 a T186. Como testemunhas, foram inoculadas porções de limo claro "in natura" (gotas do material aderente à ponta da alça de platina), em cada série de testes. Os microrganismos foram inoculados por blocos de cultura de aproximadamente  $2 \text{ mm}^2$  de superfície e incubados, conforme a metodologia descrita no item 3.3, durante 7 dias.

A avaliação foi efetuada através do peso seco dos microrganismos, frequência das características microscópicas reproduzidas (conforme padrões estabelecidos no item 3.1.2) e pelas características macroscópicas dos materiais reproduzidos (tonalidade, aspecto limoso, e formação de granulos, aglomerados ou esferas de micélio, de tamanho variável, conforme padrões estabelecidos por ocasião da avaliação).

A partir dos resultados obtidos nas 3 séries de testes preliminares, onde foram utilizadas partidas diferentes de "água servida", selecionou-se 94 tipos culturais que apresentaram um crescimento (peso seco) acima de 30 mg, e/ou que reproduziram macro e microscopicamente algumas características dos materiais limosos "in natura" (acima de 10% de hifas espessas A, conforme o item 3.1.2). Desta forma, foram testados em conjunto os tipos culturais T5, T6, T7, T9, T10, T11, T15, T17, T24, T26, T29, T30, T33, T34, T36 a T40, T42 a T51, T55, T59, T66, T68, T69, T73 a T76, T82, T84, T87 a T92, T94, T106 a T110, T113, T115 a T117, T121, T123, T124, T126 a T130, T137, T139, T140, T141, T144 a T149, T154, T157 a T160, T162 a T170, T173, T175, T176, T178, T181 a T183.

Os métodos de inoculação e incubação foram os mesmos descritos acima e, na avaliação dos resultados, foi utilizado apenas o peso seco dos microrganismos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 3 repetições. O efeito da testemunha (sem inóculo) não foi considerado na análise estatística e serviu para correção do peso seco dos tratamentos inoculados.

### 3.5. Efeito de agentes físicos e químicos no crescimento dos microrganismos "in vitro"

Com base nos levantamentos das condições ambientais dos locais de formação do limo (Figura 2), e na revisão da literatura, foram aventadas hipóteses sobre a influência da temperatura e agentes químicos no crescimento de microrganismos do limo.



### 3.5.1. Influência da temperatura

O efeito da temperatura, no crescimento e morte dos principais tipos culturais de microrganismos do limo foi estudado visando aquilatar a possível existência de microrganismos termófilos na flora microbiana das acumulações limosas, das indústrias de chapas de fibras da madeira.

Com base nos resultados obtidos no ensaio do item 3.3.3, foram selecionados 39 tipos culturais de microrganismos, de acordo com seu crescimento em "água servida" (acima de 70,0 mg) e/ou com sua habilidade em reproduzir as características microscópicas mais frequentes do limo "in natura" (acima de 20% de hifas espessas A, conforme item 3.1.2). Desta forma, os tipos culturais T5, T6, T10, T11, T15, T17, T24, T37, T38, T39, T40, T42, T43, T44, T46, T47, T50, T51, T69, T75, T76, T82, T87, T106, T107, T108, T110, T115, T117, T124, T128, T130, T137, T157, T165, T169, T170, T173 e T176, foram inoculadas por blocos de cultura de 2 mm<sup>2</sup> no centro de placas de Petri, contendo meio de "água servida"-agar (já descrito anteriormente), enriquecido com glucose a 0,5% (esterilizada separadamente). Paralelamente inoculou-se pequenas porções de limo claro (LC) "in natura", para testar a representatividade dos tipos culturais selecionados em relação a uma população mista.

Os microrganismos inoculados foram incubados durante 6 dias às temperaturas de 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50°C. As placas incubadas a 40, 45 e 50°C, foram vedadas com fita adesiva para evitar o secamento do meio de cultura.

O parâmetro de avaliação, utilizado na medição do crescimento, foi o diâmetro médio das colônias em mm. Os dados não foram submetidos à análise estatística.

Após a leitura do ensaio anterior, as placas de Petri, incubadas a 40, 45 e 50°C, foram reincubadas a 25°C durante 6 dias. O método de avaliação foi o mesmo do ensaio anterior, e da mesma forma, os dados não foram submetidos à análise estatística.

### 3.5.2. Influência de produtos químicos biocidas ou biostáticos.

Com base na revisão da literatura, na solubilidade dos produtos em água e na amplitude de seus espectros de ação biostática ou biocida (ALPER, 1960; BENIGNUS, 1948; CONKEY & CARLSON, 1963; HACKETT, 1967 e 1968; HILL, 1971; HODGMAN e cols., 1962; HOECHST, Bolt.HOE 17411 OF; LAGARDE, 1961; MARSH e cols., 1944; MONSANTO Tech. Bull. n.ºs O/FL-9, Q-444B1; ROSS, 1963; SCHMITZ e cols., 1930; SHAPIRO, 1958; THOMSON, 1973; TORGESSION, 1963; WESSEL & BEJUKI, 1959), foram utilizados os seguintes produtos e dosagens:

- Derosal, pó molhável com P.A. a 60% de 2-(metoxicar**bonilamino**)-bencimidazol, na dosagem de 30 ppm do P.A.

- Santicizer-9, pó molhável com P.A. a 100% de orto-para-toluenosulfonamida (40% na forma orto e 60% na forma para), na dosagem de 1.000 ppm.

- Merpacine, com P.A. a 1,7% de fenil acetato de mercurio, na dosagem de 10 ppm do P.A.;

- Santophem I Flakes, com P.A. a 100% de orto-benzil-para-clorofenol, na dosagem de 80 ppm.

Os produtos foram adicionados em frascos contendo 150 ml de "água servida" filtrada em areia e enriquecida com glicose a 0,5% (esterilizada separadamente). Os produtos não foram autoclavados devido às suas características termolábeis.

Utilizou-se os seguintes inóculos: 1 ml da diluição 1:10 de limo claro (LC); e, blocos de cultura (2 mm<sup>2</sup>), dos tipos culturais T44 (Trichosporon pullulans (Lindner) Diddens et Lodder) e T46 (T. cutaneum (de Beurm., Gougerot et Vaucher) Ota). Para correção dos dados de peso seco dos tratamentos inoculados, foram utilizados os seguintes tratamentos: sem inóculos com produtos (peso seco dos veículos dos produtos e dos sólidos insolúveis da "água servida") e, sem inóculos sem produtos (peso seco dos sólidos insolúveis da "água servida"). Como testemunhas utilizou-se os tratamentos com inó

culos sem produtos.

Após a inoculação os frascos foram incubados durante 10 dias nas mesmas condições descritas para o item 3.3. Como critério de avaliação, utilizou-se o peso seco do material, formado pelos microrganismos, retido em papel de filtro Whatman nº 1.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 3 repetições. O efeito da testemunha, com igual número de repetições, foi incluído na análise estatística.

## 4 - RESULTADOS

Os dados obtidos através da metodologia descrita, foram analisados em função dos objetivos propostos, proporcionando os seguintes resultados:

### 4.1. Caracterização dos materiais limosos

Os dados médios da caracterização macroscópica dos materiais limosos, amostradas em vários locais da máquina formadora do colchão, no 10º e 16º dias após a limpeza da máquina, estão apresentados no Quadro 1.

Os dados médios da porcentagem das características microscópicas analisadas, para os mesmos locais de amostragem acima referidos, estão relatados nos Quadros 2 e 3.

### 4.2. Natureza da flora microbiana dos materiais limosos

A flora microbiana do limo foi estudada através do isolamento de microrganismos pelo método de diluição em série e através do isolamento dirigido às hifas mais frequentemente encontradas nas acumulações limosas.

#### 4.2.1. Isolamento de microrganismos por diluições em série

As análises da população microbiana dos materiais limosos, das amostragens de 15/06/74, 30/07/74 e 04/11/74, apresentaram os resultados relatados no Quadro 4.

Na amostragem de 04/11/74, foram repicadas ao acaso um total de 818 colônias que, após os agrupamentos culturais e classificação sistemática, redundaram em 181 tipos culturais de microrganismos, cujos dados de frequência estão apresentados no Quadro 5. A diferença entre o número total de tipos culturais (181) acima indicado, em relação à numeração dos tipos culturais obtidos nos iso-

Quadro 1: Tonalidades das acumulações limosas coletadas ao 10º e 16º dias após a limpeza da máquina formadora do colchão de polpa.

Pontos de amostragem	DIAS APÓS A LIMPEZA DA MÁQUINA					
	10º dia (23/07/75)			16º dia (29/07/75)		
	LC	LI	LE	LC	LI	LE
P12A	0,00*	96,30	3,70	-	-	-
P12B	0,00	98,90	1,10	-	-	-
P13A	0,00	98,30	1,70	0,00	100,00	0,00
P13B	0,00	98,90	1,10	0,00	97,59	2,40
P13C	10,10	54,80	35,10	3,83	87,40	8,70
P14A	2,10	97,30	0,60	0,00	100,00	0,00
P14B	95,40	1,70	2,90	95,50	0,00	4,50
P14C	81,90	18,10	0,00	44,23	53,15	2,62
P15A	0,00	85,70	14,30	0,00	96,08	3,92
P15B	0,00	78,30	21,70	0,00	54,96	45,04
P17	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00	100,00
P19	0,00	98,40	1,60	0,70	96,19	3,11
Média	15,80	68,90	15,30	14,43	68,54	17,03

(\*) Média de 2 a 3 repetições (porcentagem do volume de cada tonalidade de material limoso em relação ao volume total de cada amostra)

(-) Não foram coletadas amostras

LC Limo de tonalidade clara

LI Limo de tonalidade intermediária

LE Limo de tonalidade escura

QUADRO 2: Caracterização microscópica das acumulações limosas ao 10º dia (23/07/75) após a limpeza da máquina formadora de colchão de polpa

TONALIDADES DO LIMO	LOCAIS DE AMOSTRAGEM	CARACTERÍSTICAS TIPOS DE HIPAS (%1)					MICROSCÓPICAS							
		A	B	C	D	E	Nº MÉDIO DE HIPAS/CAMPO	ESPORULAÇÃO (%1)		BACTÉRIAS		LEVEDURAS	IMPUREZAS	
							F	G	H	I(%2)	J(%2)	K(%2)		
CLARO	Fl3C	62,0*	0,0	27,1	6,4	4,5	21,8	6,3	0,3	0,0	71,4	6,8	9,7	
	Fl4A	27,1	47,4	16,8	1,2	7,5	37,2	0,1	0,1	0,0	0,0	0,9	12,2	
	Fl4B	81,2	0,0	8,0	3,4	7,4	36,9	5,5	0,8	1,7	8,0	1,7	8,9	
	Fl4C	90,8	0,0	7,7	0,4	1,1	42,3	14,9	0,3	0,0	16,6	2,9	4,4	
Média		65,3	11,8	14,9	2,8	5,1	34,5	6,7	0,4	0,4	24,0	3,1	8,8	
INTERMEDIÁRIO	Fl2A	77,6	0,0	21,1	0,2	1,1	27,6	0,0	0,0	0,0	0,0	1,2	40,4	
	Fl2B	84,7	0,0	2,7	0,8	11,8	36,1	0,2	1,6	0,1	3,4	13,1	61,6	
	Fl3A	91,6	0,0	7,4	0,3	0,6	40,7	1,2	0,7	0,0	2,3	4,2	60,9	
	Fl3C	85,0	0,0	10,1	3,3	1,6	25,5	2,9	2,7	0,0	18,4	5,1	38,8	
	Fl4A	65,9	0,0	26,2	4,6	3,3	29,8	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	49,8	
	Fl4B	71,0	0,0	20,6	4,6	3,9	36,9	1,0	2,1	0,0	9,3	0,0	51,8	
	Fl4C	74,0	0,0	9,4	4,1	12,4	41,1	13,0	2,1	0,0	5,9	1,1	46,2	
	Fl5A	83,8	0,0	9,5	1,3	5,4	32,2	0,9	2,7	0,0	3,9	0,6	66,2	
ESCURO	Fl5B	84,4	0,0	8,8	1,4	5,4	29,3	3,7	2,5	0,0	4,5	8,2	45,7	
	Fl9	78,4	0,0	12,5	5,5	3,6	33,5	0,9	1,5	0,0	4,9	10,6	57,9	
	Média		79,6	0,0	12,8	2,6	4,9	33,3	2,4	1,6	0,0	5,3	4,5	52,0
	LIMO	Fl2A	40,3	3,5	46,1	4,8	5,2	18,4	2,6	0,0	0,0	0,0	1,3	46,9
Fl2B		77,0	4,1	5,4	6,7	6,8	32,7	3,4	0,4	0,0	5,2	11,2	55,5	
Fl3A		86,6	0,0	6,1	0,7	6,6	45,5	0,5	4,1	0,5	5,7	4,9	61,8	
Fl3C		74,3	0,0	7,8	1,2	16,6	31,5	3,9	5,4	0,0	10,9	4,9	53,2	
Fl4A		44,8	0,0	17,8	5,7	31,7	27,1	3,6	2,5	0,1	0,0	1,5	57,0	
Fl4B		80,3	0,0	12,0	2,5	5,2	46,7	8,2	2,7	0,0	0,7	2,1	58,0	
Fl5A		82,1	0,5	8,7	1,3	7,3	37,4	1,2	4,7	0,0	4,0	4,0	49,6	
Fl5B		74,5	0,0	13,6	5,4	6,4	31,9	42,8	4,4	0,0	1,4	13,3	62,9	
Fl7		5,4	0,0	18,2	6,6	69,8	24,1	3,1	30,5	0,0	0,0	3,9	55,4	
Média	Fl9	76,6	0,0	10,4	5,6	7,5	27,9	3,1	2,4	0,1	6,4	11,3	62,7	
		64,2	0,8	14,6	4,1	16,3	32,3	7,2	5,7	0,1	3,4	5,8	55,4	
MÉDIA GERAL		69,7	4,2	14,1	3,2	8,8	33,4	5,4	2,6	0,2	10,9	4,5	39,1	

\* = Média de 3 repetições (lâminas) e, cada repetição constituída pela leitura média de 5 campos microscópicos de 400x, casualizados em relação ao material da lâmina.

(%1) = em relação ao número total de hifas A, B, C, D e E

(%2) = em relação à área total do campo microscópio projetado pela câmara lúcida (70,85 cm<sup>2</sup>)

A = hifas de 7,8 µ de espessura, hialinas com septos em relevo;

F = hifas formando artrosporos, blastosporos e outros esporos;

B = hifas de 10,2 µ de espessura, sub-hialinas;

G = hifas formando clamidosporos;

C = hifas de 4,4 µ de espessura, cilíndricas, hialinas;

H = bacilos em longas cadeias;

D = hifas de 2,5 µ de espessura;

I = bacilos em aglomerados mucilaginosos;

E = pseudo-hifas e outras hifas diferentes de A, B, C e D;

J = leveduras em aglomerados mucilaginosos;

K = fibras e outras impurezas.

QUADRO 3: Caracterização microscópica das acumulações de limosas ao 16º dia (29/01/75) após a limpeza da máquina formadora de colchão de polpa.

TONALIDADES DO LIMO	LOCALS DE AMOSTRAGEM	CARACTERÍSTICAS TIPOS DE HIFAS (%1)					MICROSCÓPICAS						
		A	B	C	D	E	Nº MÉDIO DE HIFAS/CAMPO	ESTRIBULAÇÃO (%1)			BACTÉRIAS		LEVE-DURAS J(%2)
LIMO CLARO	Fl3C	67,7*	0,0	1,7	7,0	23,2	18,1	3,2	6,8	6,5	62,7	9,6	8,7
	Fl4B	96,0	0,0	0,9	0,0	3,1	47,1	15,1	2,3	0,0	22,8	4,1	5,3
	Fl4C	99,6	0,0	0,2	0,2	0,0	34,2	1,5	0,6	44,9	20,9	0,0	6,2
	Fl9	92,2	0,7	3,8	0,6	2,7	45,5	2,6	1,9	0,0	5,1	12,7	18,7
Média		88,9	0,2	1,6	2,0	7,3	36,2	5,6	2,9	12,8	27,9	6,6	9,7
LIMO INTERMEDIÁRIO	Fl3A	90,6	0,0	4,8	0,8	3,8	38,9	2,4	1,4	0,0	2,4	4,6	60,2
	Fl3B	90,7	0,0	3,3	1,2	4,8	36,3	1,0	2,0	0,2	3,0	5,1	61,6
	Fl3C	90,0	0,0	3,7	0,3	6,0	36,3	2,5	2,1	0,2	2,0	7,9	54,0
	Fl4A	92,0	0,0	2,1	0,5	5,4	43,9	2,7	1,5	0,0	1,0	7,6	63,7
LIMO ESCURO	Fl4C	51,7	0,0	1,8	1,0	45,5	33,1	15,0	6,8	0,0	7,4	9,9	66,1
	Fl5A	46,4	45,8	3,2	1,9	2,8	26,1	0,5	1,2	0,1	3,4	5,0	73,7
	Fl5B	60,0	17,9	12,2	2,6	7,3	25,8	1,4	1,9	0,0	2,6	6,5	62,2
	Fl9	83,9	0,0	8,5	3,6	4,0	30,5	2,3	2,0	0,0	1,3	5,0	49,0
Média		75,7	8,0	4,9	1,6	10,8	38,4	3,5	2,4	0,1	2,9	6,5	61,3
LIMO ESCURO	Fl3B	70,9	0,0	0,0	13,9	15,2	12,6	5,2	20,9	33,7	36,2	7,5	48,3
	Fl3C	67,4	0,0	4,7	5,5	22,4	23,0	10,5	10,9	0,0	4,4	14,5	60,3
	Fl4B	69,8	0,0	8,4	5,4	16,4	25,2	7,8	7,7	0,0	4,5	11,5	67,2
	Fl4C	60,3	0,0	5,0	4,9	27,9	19,4	5,3	6,4	0,0	4,4	9,1	74,4
LIMO ESCURO	Fl5A	74,5	11,4	3,7	3,1	7,3	21,7	1,0	6,1	0,0	2,4	5,0	71,4
	Fl5B	82,3	1,9	8,8	4,4	2,6	29,4	10,1	6,9	1,7	3,1	12,4	66,0
	Fl7	44,9	0,0	9,6	11,1	36,1	9,2	7,3	34,5	0,0	2,9	5,6	84,5
	Fl9	47,3	0,0	11,4	30,5	10,8	19,5	13,4	11,6	0,2	3,1	16,6	66,1
Média		64,7	1,7	6,5	9,8	17,3	20,0	7,6	13,1	4,5	7,6	10,3	75,5
MÉDIA GERAL		76,4	3,3	4,3	4,5	11,8	31,5	5,6	6,1	5,8	12,8	7,3	48,8

\* = Média de 3 repetições (lâminas) e, cada repetição constituída pela leitura média de 5 campos microscópicos de 400x, casualizadas em relação ao material da lâmina.

(%1) = em relação ao número total de hifas A, B, C, D e E

(%2) = em relação à área total do campo microscópico projetado pela câmara lucida (70,85 cm<sup>2</sup>)

A = hifas de 7,8 µ de espessura, hialinas com septos em relevo; F = hifas formando estrosporos, blastosporos e outros esporos;  
 B = hifas de 10,2 µ de espessura, sub-hialinas; G = hifas formando clamidosporos;  
 C = hifas de 4,4 µ de espessura, cilíndricas, hialinas; H = bacilos em longas cadeias;  
 D = hifas de 2,5 µ de espessura; I = bacilos em aglomerados mucilaginosos;  
 E = pseudo-hifas e outras hifas diferentes de A, B, C e D; J = leveduras em aglomerados mucilaginosos;  
 K = fibras e outras impurezas

lamentos por diluições em série (T1 a T185), deve-se à perda de viabilidade de alguns microrganismos no decorrer dos trabalhos.

Quadro 4. População microbiana de algumas amostras de materiais limosos coletadas em indústrias de chapas de fibras de madeira.

DATA DAS AMOSTRAS	Nº de propágulos viáveis/ml de limo		
	LIMO CLARO	LIMO INTERMEDIÁRIO	LIMO ESCURO
15/06/74	$2,4 \times 10^7$	$37,3 \times 10^7$	$8,6 \times 10^7$
30/07/74	$5,7 \times 10^7$	$2,3 \times 10^7$	$3,4 \times 10^7$
04/11/74	$2,4 \times 10^7$	$7,7 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$
MÉDIA	$3,5 \times 10^7$	$15,7 \times 10^7$	$4,3 \times 10^7$

Os dados sobre as características morfológicas de todos os tipos culturais e dos testes fisiológicos, aplicados às leveduras, estão transcritos no Quadro I do Apêndice.

#### 4.2.2. Isolamento de microrganismos dirigido às hifas mais frequentes do limo.

Foram isolados 116 microrganismos (ID1 a ID116) que após a purificação, foram agrupados nos tipos culturais relacionados no Quadro 6.

Um total de 6 microrganismos foram agrupados num tipo cultural (T186), diferente dos tipos culturais isolados anteriormente pelo método de diluições em série.

#### 4.2.3. Hábitos vegetativos e reprodutivos das hifas mais frequentes do limo

Os resultados do estudo do crescimento e reprodução de hifas espessas (A) e do tipo cultural T46 (*T. cutaneum*), obtido por isolamento dirigido a essas hifas, encontram-se ilustrados nas Figuras 5 a 7.



Quadro 5: Microrganismos isolados de materiais limosos de colorações clara, intermediária e escura, pelo método de diluições em série.

Microrganismos	Tipos cult.	FREQUÊNCIA DE ISOLADOS			TOTAL	%(*)
		Limo claro	Limo inter.	Limo esc.		
<u>Trichosporon cutaneum</u> (de Beurm., Gougerot et Vaucher) Ota	T6	8	10	1	19	2,32
	T15	4	14	7	25	3,06
	T23	1	0	0	1	0,12
	T37	5	0	0	5	0,61
	T38	0	2	0	2	0,24
	T42	0	1	0	1	0,12
	T46	1	1	1	3	0,36
	T47	30	12	0	42	5,13
	T69	0	7	2	9	1,10
	T75	1	2	0	3	0,36
	T76	1	1	0	2	0,24
	T87	23	5	2	30	3,67
	T110	6	0	0	6	0,73
	T115	6	2	0	8	0,98
	T117	6	1	0	7	0,86
	T124	1	0	0	1	0,12
	T128	2	0	0	2	0,24
	T130	1	1	0	2	0,24
	T137	19	13	2	34	4,16
	T157	1	0	0	1	0,12
T165	0	2	0	2	0,24	
T170	0	1	0	1	0,12	
T173	1	0	0	1	0,12	
Total	23	117	75	15	207	25,30
%(**)	-	36,45	23,51	8,42	-	-
<u>Trichosporon fermentans</u> Diddens et Lodder	T177	0	0	2	2	0,24
%(**)	-	0,00	0,00	1,12	-	-
<u>Trichosporon inkin</u> (Oho) Do Carmo-Sousa et Van Udem	T50	3	1	1	5	0,61
%(**)	-	0,93	0,31	0,56	-	-
<u>Trichosporon pullulans</u> (Lindner) Diddens et Lodder	T26	1	4	0	5	0,61
T41	0	0	1	1	0,12	
T44	0	1	0	1	0,12	
T61	0	1	0	1	0,12	
T63	2	1	0	3	0,36	
T125	1	0	0	1	0,12	
T127	2	0	0	2	0,24	
T129	2	0	0	2	0,24	
T145	1	0	0	1	0,12	
T147	1	0	0	1	0,12	
T167	2	3	0	5	0,61	
Total	11	12	10	1	23	2,81
%(**)	-	3,74	3,13	0,56	-	-

(continua)

Quadro 5: continuação

Microrganismos	Tipos cult.	FREQUÊNCIA DE ISOLADOS				%(*)	
		Limo claro	Limo inter.	Limo esc.	TOTAL		
<u>Trichosporon</u> spp	T21	0	0	1	1	0,12	
	T35	0	1	0	1	0,12	
	T40	1	0	0	1	0,12	
	T45	0	0	1	1	0,12	
	T59	1	1	0	2	0,24	
	T60	0	1	0	1	0,12	
	T68	1	9	0	10	1,22	
	T82	0	2	0	2	0,24	
	T106	3	0	0	3	0,36	
	T107	2	0	0	2	0,24	
	T108	1	0	0	1	0,12	
	T109	1	0	0	1	0,12	
	T113	2	0	0	2	0,24	
	T114	1	0	0	1	0,12	
	T118	1	4	0	5	0,61	
	T123	1	0	0	1	0,12	
	T126	1	0	0	1	0,12	
	T136	0	0	1	1	0,12	
	T140	1	0	0	1	0,12	
	T144	1	0	0	1	0,12	
	T148	2	0	0	2	0,24	
	T149	2	0	0	2	0,24	
	T158	1	0	0	1	0,12	
	T159	2	0	0	2	0,24	
	T166	3	0	0	3	0,36	
	T168	1	0	0	1	0,12	
	T175	1	0	0	1	0,12	
	T176	1	0	0	1	0,12	
	T178	1	0	0	1	0,12	
	T180	1	0	1	2	0,24	
	T181	1	0	0	1	0,12	
	T183	1	0	0	1	0,12	
	TOTAL	32	35	18	4	57	6,97
	%(**)	-	10,90	5,64	2,24	-	-
Total para o gênero		68	167	104	23	294	35,94
<u>Trichosporon</u>							
	%(**)	-	52 02	32 60	12 92	-	-
<u>Candida curvata</u> (Diddens et Lodder) Lodder et Kreger-van Rij	T5	1	0	1	2	0,24	
<u>Candida</u> spp	T100	24	2	1	27	3,30	
	T164	1	0	0	1	0,12	
	T174	0	0	2	2	0,24	

(continua)

Quadro 5: continuação

Microrganismos	Tipos cult.	FREQUÊNCIA DE ISOLADOS				TOTAL	%(*)
		Limo claro	Limo inter.	Limo esc.			
<u>Candida</u> spp	T184	0	0	2	2	0,24	
	185	0	0	1	1	0,12	
	TOTAL	6	26	2	7	35	4,27
	%(**)	-	8 10	0 63	3 93	-	-
<u>Endomycopsis bispora</u> (Beck) Dekker	T24	1	0	0	1	0,12	
<u>Endomycopsis</u> sp	T49	0	1	0	1	0,12	
	TOTAL	2	1	1	0	2	0,24
	%(**)	-	0 31	0 31	0 00	-	-
<u>Sporobolomyces salmonicolor</u> (Fischer et Brebeck) Kluyver et van Niel	T138	0	0	1	1	0,12	
	%(**)	-	0,00	0,00	0,56	-	-
<u>Cryptococcus</u> spp	T14	1	2	0	3	0,36	
	T32	1	1	0	2	0,24	
	TOTAL	2	3	0	5	0,61	
	%(**)	-	0,62	0,94	0,00	-	-
<u>Hansenula anomala</u> (Hansen) H. et P. Sydow	T119	7	0	1	8	0,98	
	%(**)	-	2,18	0,00	0,56	-	-
<u>Kluyveromyces bulgaricus</u> (Santa Maria) v.d. Walt	T7	1	3	6	10	1,22	
	%(**)	-	0,31	0,94	3,37	-	-
<u>K. drosophilae</u> (Shehata, Mrak et Phaff) v.d. Walt	T22	0	3	0	3	0,36	
	T141	1	0	0	1	0,12	
	TOTAL	2	3	0	4	0,48	
	%(**)	-	0,31	0,94	0,00	-	-
<u>K. marxianus</u> (Hansen) v.d. Walt	T8	0	1	2	3	0,36	
	T13	9	14	5	28	3,42	
	T25	4	15	9	28	3,42	
	T56	2	2	3	7	0,86	
	T78	5	12	11	28	3,42	
	T120	3	3	0	6	0,73	
	T132	1	3	0	4	0,49	
	T135	1	3	0	4	0,49	
	T154	2	3	0	5	0,61	
	TOTAL	9	56	30	113	13,81	
	%(**)	-	8,41	17,55	16,85	-	-
<u>K. phaseolusporus</u> (Shehata, Mrak et Phaff) v.d. Walt	T1	8	35	24	67	8,19	
	%(**)	-	2,49	10,97	13,48	-	-

(continua)

Quadro 5: continuação

MICROORGANISMOS	Tipos cult.	FREQUÊNCIA DE ISOLADOS				TOTAL	% (*)
		Limo claro	Limo inter.	Limo esc.			
<u>K. vanudenii</u> (v.d. Walt et Nel) v.d. Walt	T4	5	3	3	11	1,34	
	T27	2	5	4	11	1,34	
	T150	2	0	0	2	0,24	
	T153	2	2	1	5	0,61	
	TOTAL	4	11	10	8	29	3,54
	%(**)	-	3,43	3,13	4,49	-	-
<u>Kluyveromyces</u> spp	T33	0	0	1	1	0,12	
	T53	1	8	1	10	1,22	
	T79	2	2	3	7	0,86	
	T99	1	0	0	1	0,12	
	T102	4	1	20	25	3,06	
	T104	3	0	1	4	0,49	
	T142	3	2	1	6	0,73	
	T151	2	0	0	2	0,24	
	T152	2	0	0	2	0,24	
	T155	0	2	0	2	0,24	
	T179	0	1	0	1	0,12	
	T182	0	0	1	1	0,12	
		TOTAL	12	18	16	28	62
	%(**)	-	5 60	5 01	15 73	-	-
Total para o gênero <u>Kluyveromyces</u>		29	66	123	96	285	34,84
	%(**)	-	20 56	38 55	53 93	-	-
<u>Pichia</u> sp	T131	2	0	2	4	0,49	
	%(**)	-	0,62	0,00	1,12	-	-
<u>Rhodotorula glutinis</u> (Fres.) Harrinson	T70	0	1	0	1	0,12	
<u>R. rubra</u> (Derme)Lodder	T71	0	2	0	2	0,24	
	T72	0	1	0	1	0,12	
	TOTAL	3	0	4	0	4	0,49
	%(**)	-	0,00	1,25	0,00	-	-
<u>Torulopsis</u> sp	T54	8	4	12	24	2,93	
	%(**)	-	2,49	1,25	6,74	-	-
Não Classificados:							
Leveduras não micelianas	T134	2	0	0	2	0,24	
	T171	5	0	2	7	0,86	
	T172	0	0	1	1	0,12	
Leveduras pseudo-micelianas	T112	2	1	0	3	0,36	
	T143	2	0	0	2	0,24	
Leveduras micelianas	T2	0	0	1	1	0,12	
	T58	0	1	0	1	0,12	
	TOTAL	7	11	2	4	17	2,07
	%(**)	-	3,43	0,62	2,25	-	-

(continua)

Quadro 5: continuação

MICROORGANISMOS	Tipos cult.	FREQUÊNCIA DE ISOLADOS				TOTAL	%(*)
		Limo claro	Limo inter.	Limo esc.			
<u>Penicillium</u> spp	T9	0	1	0	1	0,12	
	T10	0	0	1	1	0,12	
	T17	3	6	0	9	1,10	
	T51	0	2	1	3	0,36	
	T52	0	5	0	5	0,61	
	T55	1	0	0	1	0,12	
	T64	0	1	0	1	0,12	
	T66	0	3	0	3	0,36	
	T73	0	1	0	1	0,12	
	T74	0	1	1	2	0,24	
	T81	0	0	1	1	0,12	
	T84	0	1	0	1	0,12	
	T88	0	1	2	3	0,36	
	T89	0	4	2	6	0,73	
	T90	2	2	1	5	0,61	
	T91	1	2	2	5	0,61	
	T92	0	2	1	3	0,36	
	T93	0	2	0	2	0,24	
	T94	0	0	1	1	0,12	
	T95	0	1	0	1	0,12	
	T96	0	1	2	3	0,36	
	T103	1	1	0	2	0,24	
	T116	0	0	1	1	0,12	
	T121	0	1	0	1	0,12	
	T139	0	0	1	1	0,12	
	T146	0	0	1	1	0,12	
	T156	1	0	0	1	0,12	
	T160	1	0	0	1	0,12	
	T161	0	1	0	1	0,12	
	T162	2	0	0	2	0,24	
	T163	0	1	0	1	0,12	
	T169	0	1	0	1	0,12	
	TOTAL	32	12	41	18	71	8,68
	%(**)	-	3,74	12,85	10,11	-	-
<u>Aspergillus niger</u> van Tiegh	T43	2	16	3	21	2,57	
	%(**)	-	0,62	5,01	1,68	-	-
<u>Aspergillus</u> spp	T85	1	0	1	2	0,24	
	T86	0	1	0	1	0,12	
	T97	0	1	0	1	0,12	
	TOTAL	3	1	2	1	4	0,49
	%(**)	-	0,31	0,63	0,56	-	-

(continua)

Quadro 5: continuação

Microrganismos	Tipos cult.	FREQUÊNCIA DE ISOLADOS				TOTAL	%(*)
		Limo claro	Limo inter.	Limo esc.			
<u>Beauveria</u> sp	T105	0	0	1	1	0,12	
	%(**)	-	0,00	0,00	0,56	-	
<u>Cephalosporium</u> spp	T67	0	1	0	1	0,12	
	T83	0	1	0	1	0,12	
	TOTAL	2	0	2	0	2	
	%(**)	-	0,00	0,63	0,00	-	
<u>Cladosporium</u> sp	T18	0	0	1	1	0,12	
	%(**)	-	0,00	0,00	0,56	-	
<u>Graphium</u>	T48		1	0	1	0,12	
0 00 0 56	%(**)	-	0,00	0,31	0,00	-	
<u>Isaria</u> sp	T65			0	1	0,12	
	%(**)	-	0,00	0,31	0,00	-	
<u>Mucor</u> sp	T77	0	0	1	1	0,12	
	%(**)	-	0,00	0,00	0,56	-	
<u>Paecilomyces</u> spp	T34	0	1	0	1	0,12	
	T39	1	1	0	2	0,24	
	TOTAL	2	1	2	0	3	
	%(**)	-	0,31	0,62	0,00	-	
<u>Steccherinum</u> spp	T29	3	1	0	4	0,49	
	T30	0	0	1	1	0,12	
	TOTAL	2	3	1	1	5	
	%(**)	-	0,93	0,31	0,56	-	
<u>Trichoderma</u> viride	T11	0	1	0	1	0,12	
Pers	T36	1	4	0	5	0,61	
	TOTAL	2	1	5	0	6	
	%(**)	-	0,31	1,57	0,00	-	
Eumicetos não classificados	T12	2	1	0	3	0,36	
	T28	0	0	1	1	0,12	
	T19	1	0	0	1	0,12	
	T98	1	0	0	1	0,12	
	T101	1	0	0	1	0,12	
	TOTAL	5	5	1	1	7	
	%(**)	-	1,56	0,31	0,56	-	

(continua)

Quadro 5: continuação

MICROORGANISMOS	Tipos cult.	FREQUÊNCIA DE ISOLADOS				TOTAL	% (*)
		Limo claro	Limo inter.	Limo esc.			
Bactérias (bacilos)	T57	0	3	0	3	0,36	
	T62	3	0	0	3	0,36	
	T80	0	0	5	5	0,61	
	T111	2	0	0	2	0,24	
	T122	0	1	0	1	0,12	
	T133	1	0	0	1	0,12	
	TOTAL	6	4	5	15	1,83	
	% (**)	-	1,87	1,25	2,81	-	
T O T A L G E R A L		182	321	319	178	818	-

(\*) Porcentagem sôbre o total de microrganismos agrupados.

(\*\*) Porcentagem sôbre os microrganismos isolados de cada tipo de limo (claro, intermediário ou escuro).

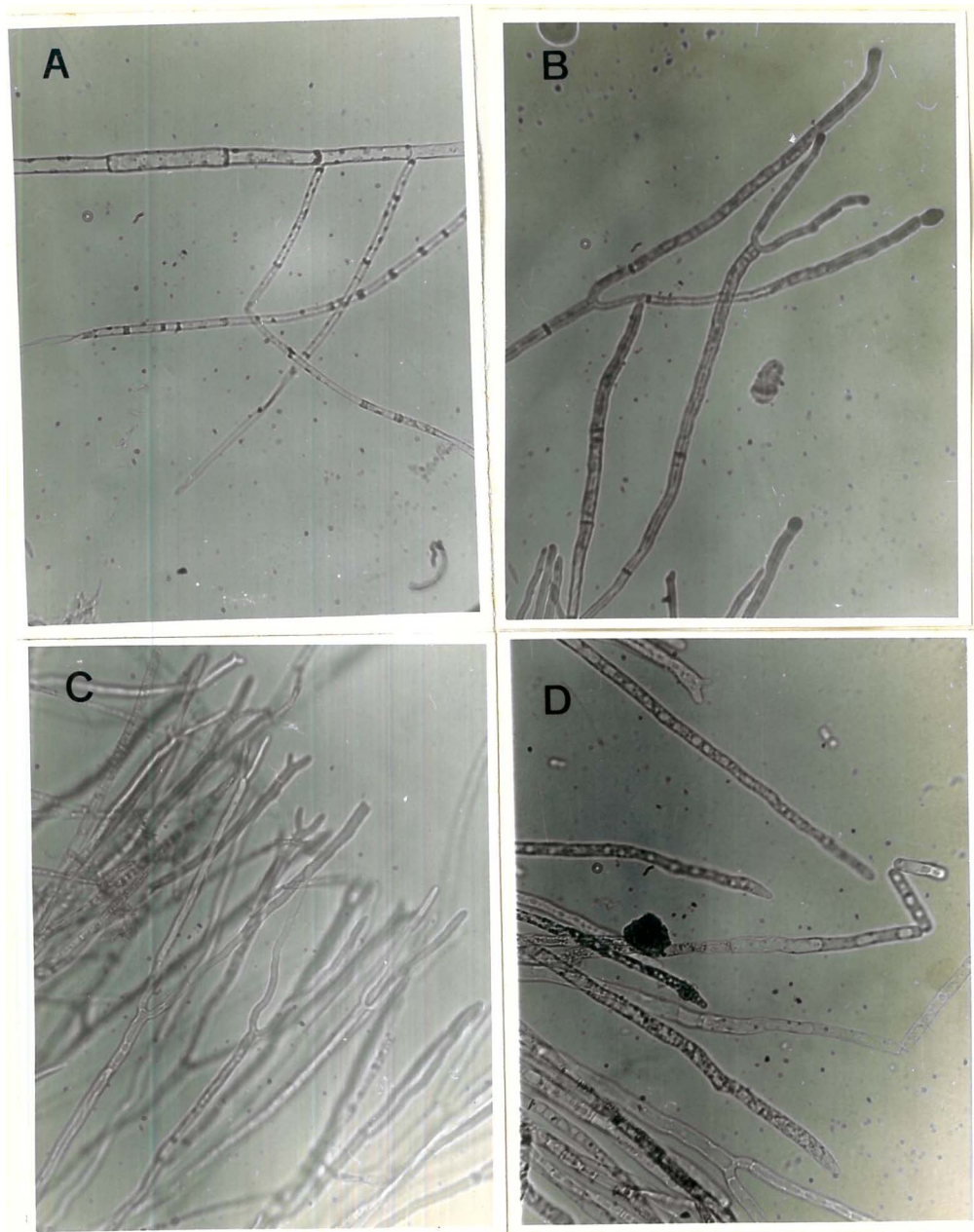


Figura 5: Desenvolvimento inicial de hifas espessas do limo (característica microscópica A). Hifa espessa inoculada em meio de "água servida" por micromanipulação (A); formação de ramificações dicotômicas (B); aspecto geral das ramificações dicotômicas (C); início da reprodução assexuada através de artrosporos (D).



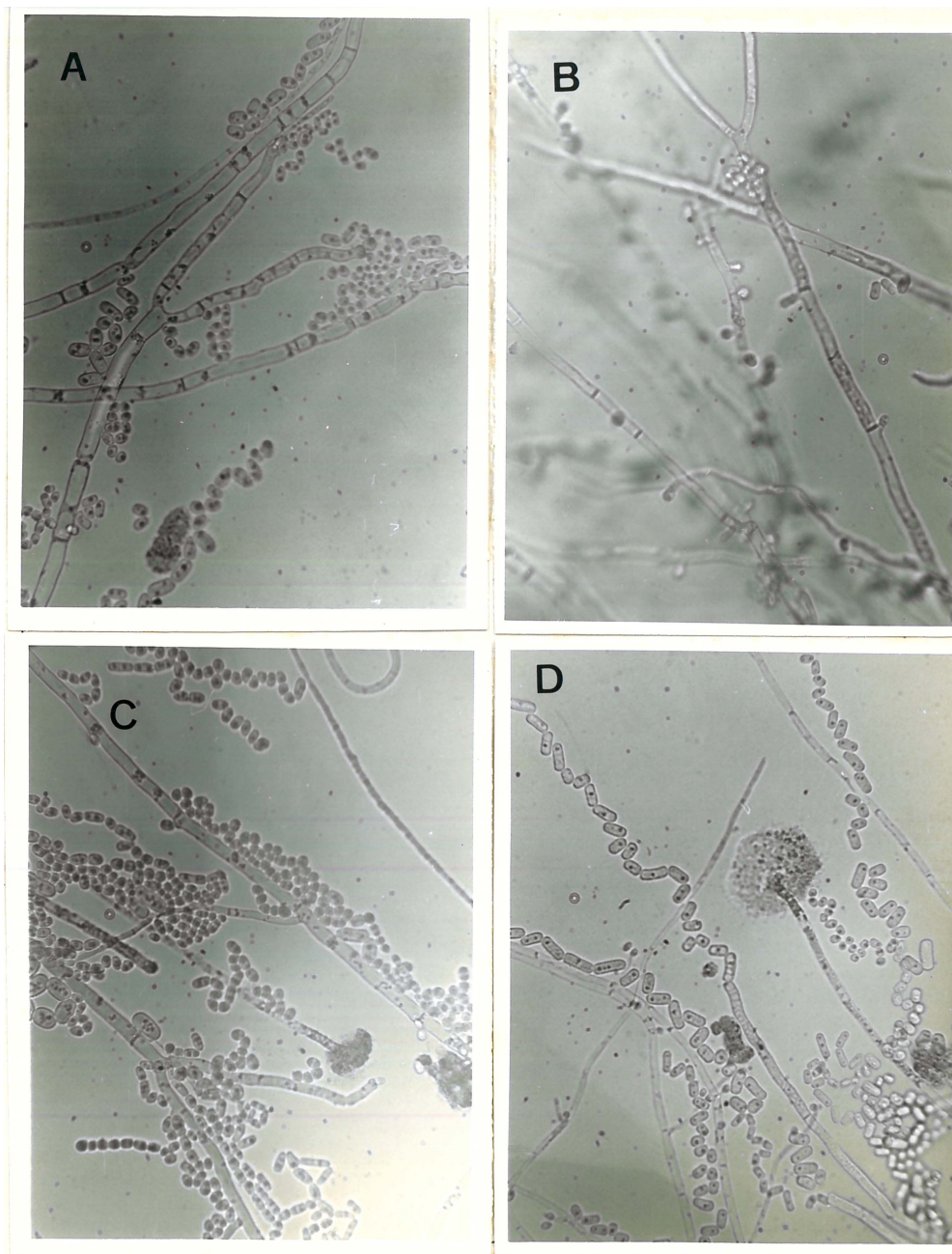


Figura 6: Estágios da reprodução assexual das hifas espessas do limo. Formação de artrosporos de formas e tamanho variáveis (A, C e D); formação de blastosporos (B e C); exsudações citoplasmáticas não identificadas (C e D).

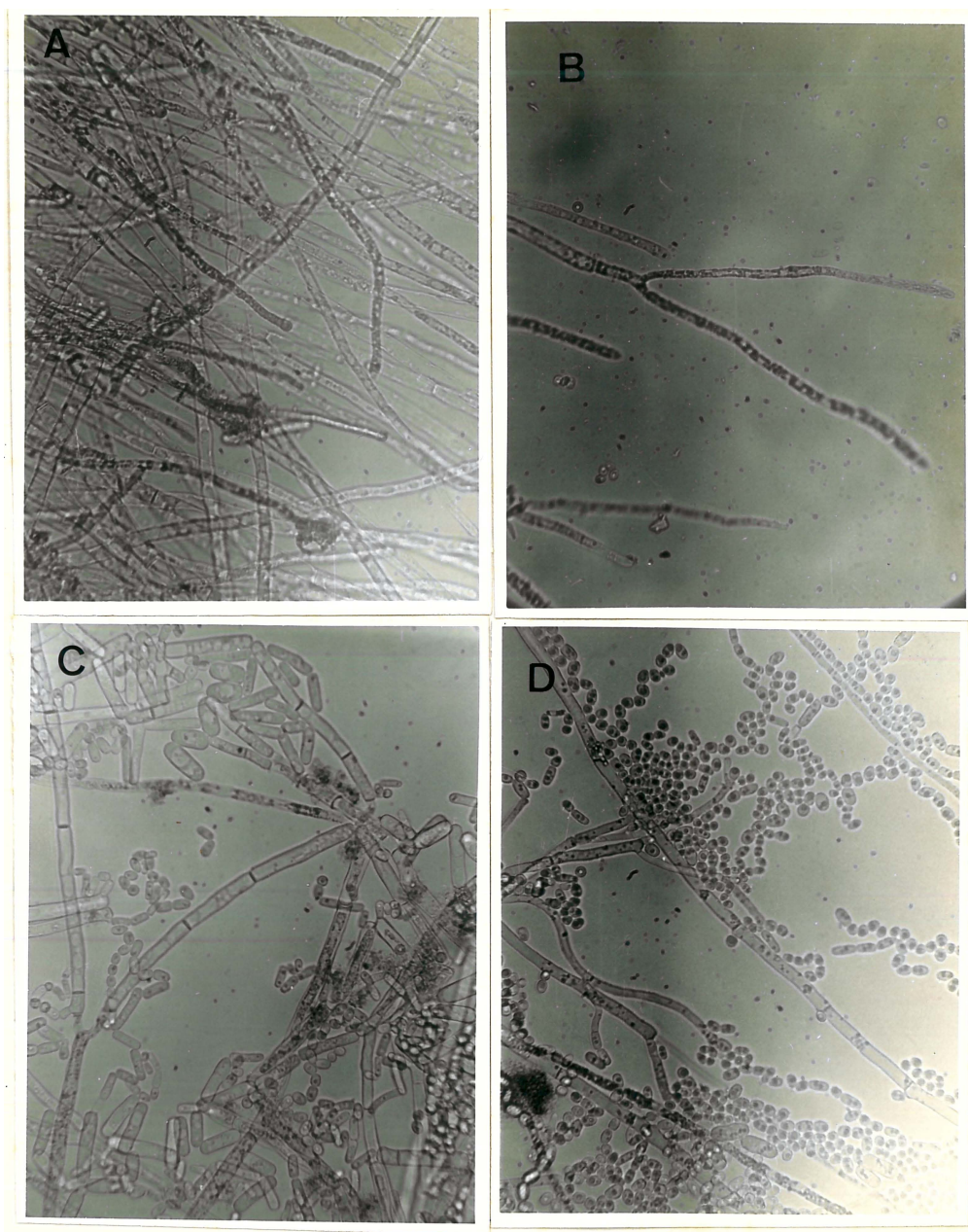


Figura 7: Estágios de desenvolvimento e reprodução assexual de Trichosporon cutaneum, (T46), obtido através de isolamentos dirigidos às hifas espessas do limo. Aspecto miceliano com abundância de hifas espessas (A); ramificação terminais - dicotômica (B); formação de artrosporos de formas e tamanho variáveis (C e D); formação de blastosporos (D); exsudações citoplasmáticas não identificadas (A).

QUADRO 6: Frequência de microrganismos, isolados de materiais limos de tonalidade clara e intermediária, pelo método de isolamento dirigido às hifas mais frequentes do limo "in natura".

Microrganismos	Tipos cult.	FREQUÊNCIA DE ISOLADOS			%(*)
		Limo claro	Limo interm.	TOTAL	
<u>Trichosporon cutaneun</u>	T15	50	6	56	48,27
	T46	13	0	13	11,21
	T87	1	0	1	0,86
	T115	5	1	6	5,17
	TOTAL	4	7	76	65,52
	%(**)	-	-	-	-
<u>Trichosporon spp</u>	T158	1	2	3	2,58
	T166	19	5	24	20,69
	TOTAL	2	7	27	23,27
	%(**)	-	-	-	-
Total para o gênero <u>Trichosporon</u>				103	88,79
	%(**)	100,00	51,85	-	-
<u>Kluyveromyces sp</u>	T33	0	7	7	6,03
	%(**)	0,00	25,93	-	-
<u>Monileaceae(Sporotrichum?)</u>	T186	0	6	6	5,17
	%(**)	0,00	22,22	-	-
T O T A L G E R A L		89	27	116	

(\*) Porcentagem do total de isolamentos dirigidos

(\*\*) Porcentagem sobre o numero de isolados de cada tonalidade de limo (claro e intermediário)

A análise dessas figuras mostra, para ambos os casos, um desenvolvimento inicial de hifas espessas com septos em relêvo, bifurcando-se dicotomicamente nas extremidades e, com reprodução vegetativa através da formação de artrosporos de tamanho e forma variáveis e blastosporos. Nas Figuras 6 e 7 observaram-se também certas exsudações citoplasmáticas terminais, não identificadas.

#### 4.3. Fatores relacionados com a avaliação do crescimento de microrganismos, em meio líquido de "água servida"

Os ensaios preliminares para determinar a influência da época de coleta dos ensaios e da concentração do inóculo, na avaliação do crescimento de microrganismos em meio líquido de "água servida", propiciaram os resultados relatados a seguir.

##### 4.3.1. Influência do período de incubação

Os dados originais, referentes ao crescimento de microrganismos, em mg de peso seco, em diferentes períodos de incubação, são apresentados no Quadro II do apêndice.

A aplicação do teste F, de acordo com o esquema fatorial do ensaio, indicou efeitos altamente significativos de inóculos, épocas de leitura e uma interação entre ambos. O desdobramento do número de graus de liberdade desta interação e a aplicação do teste de Tukey, mostrou os resultados relatados na Figura 8.

##### 4.3.2 - Influência da concentração do inóculo

Os dados originais relativos à influência do potencial de inóculo no crescimento de microrganismos em meio líquido de "água servida", estão apresentados no Quadro III do apêndice.

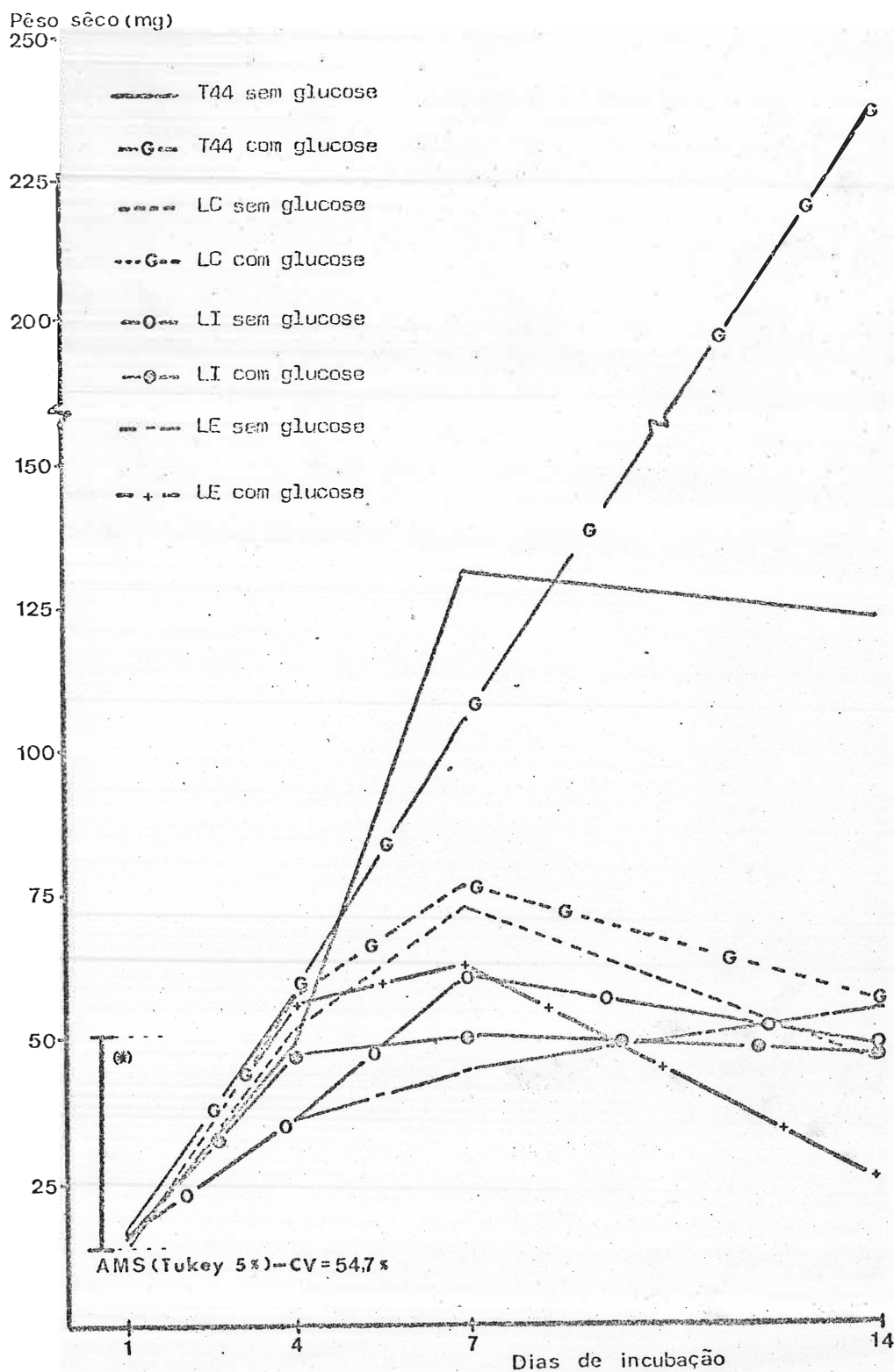


Figura 8: Curvas de crescimento de populações naturais de materiais limosos de tonalidades clara (LC), intermediária (LI) e escura (LE), e, do microrganismo T44 (*Trichosporon pululans*), em substratos enriquecidos ou não com glucose.

(\*) Válido para confrontar cada inóculo nos diferentes períodos de incubação

A aplicação do teste F indicou diferenças altamente significativas entre os tratamentos, e os resultados da aplicação do teste de Tukey, são apresentados na Figura 9.

#### 4.4. Características do cultivo de microrganismos isolados do limo, em meio líquido de "água servida"

Os dados médios do peso seco e das avaliações macro e microscópicas do crescimento de microrganismos isolados do limo, obtidos preliminarmente pelo cultivo de 182 tipos culturais em meio líquido de "água servida" são apresentados no Quadro 7.

A aplicação do teste F, aos dados originais de peso seco, obtidos com o teste conjunto de 94 tipos culturais selecionados após os resultados preliminares do Quadro 7, indicou diferenças altamente significativas entre tratamentos. A aplicação do teste Tukey, às médias dos gêneros e de algumas espécies de microrganismos, apresentou os resultados sintetizados no Quadro 8.

#### 4.5. Efeito de agentes físicos e químicos no crescimento de microrganismos, "in vitro"

O efeito de agentes físicos e químicos no crescimento de microrganismos isolados do limo, bem como de populações naturais dos materiais limosos, apresentaram os resultados relacionados a seguir:

##### 4.5.1. Influência da temperatura

Os dados médios da temperatura inibitória e letal ao crescimento de 39 tipos culturais de microrganismos isolados do limo, bem como de uma população natural de limo claro, são apresentados no Quadro 9.

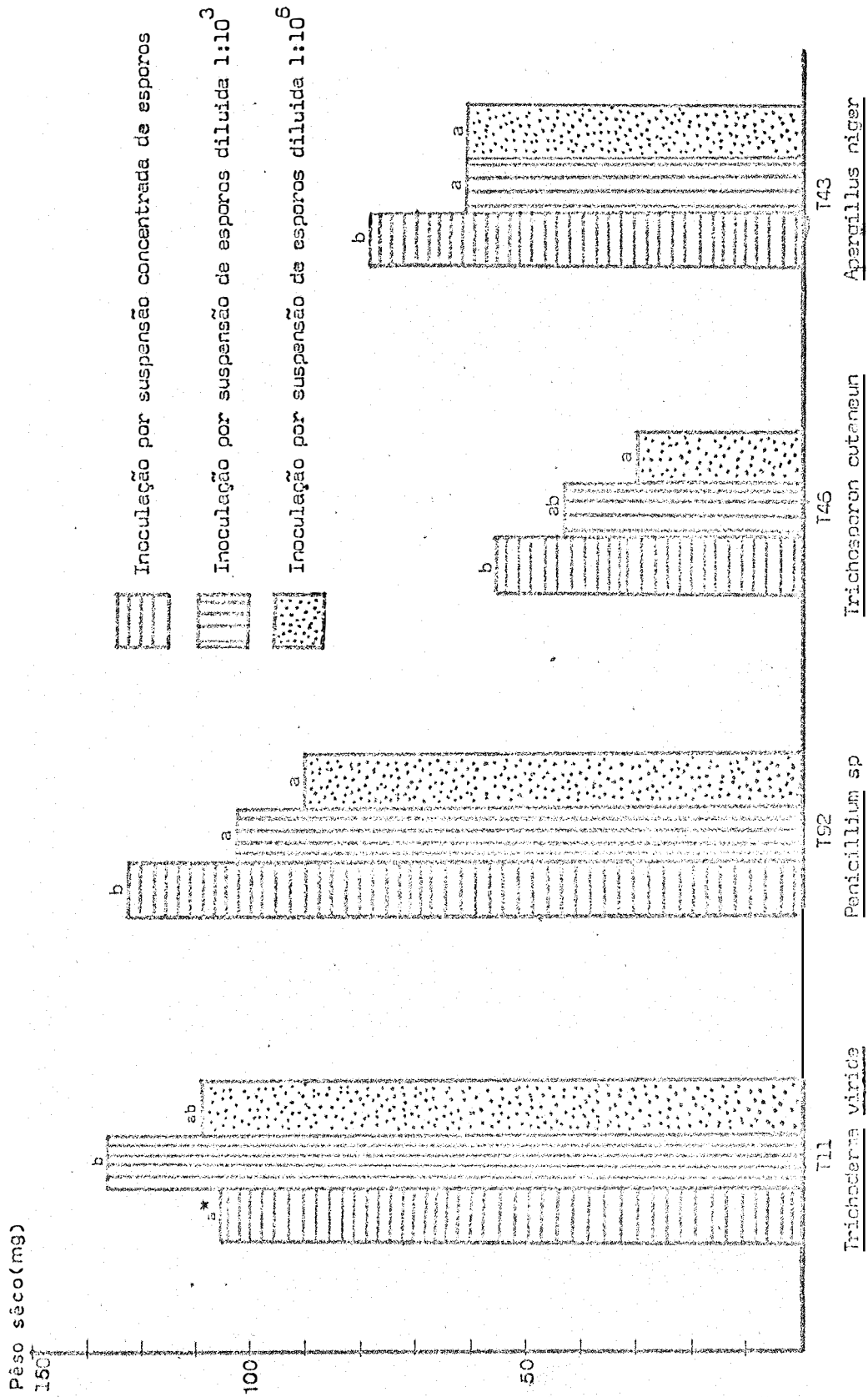


Figura 9: Influência da concentração de inóculo no crescimento de alguns microrganismos isolados do limo, em meio líquido de "água servida".

(\* Para cada microrganismo, as colunas seguidas por letras iguais não diferem significativamente ao nível de 1% de probabilidade (teste de Tukey) - CV = 9,3%.

QUADRO 7: Caracterização macro e microscópica do crescimento "in vitro" de 182 tipos culturais de microrganismos isolados de acumulações límpidas de indústrias de celulose e fibras de madeira.

MICROORGANISMOS	TIPO CULTURAL	AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA		IDEOCOCOS (mg)	CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA									
		MATERIAL FORMADO	TOTALIDADE		FREQUÊNCIA DE HIPAS(%)			ESPORULAÇÃO (%)			BACTÉRIAS LEVEDURAS			
					A	B	C	D	E	F	G	H	I(%)	J(%)
<i>Trichosporon</i>	T6	aglom. de limo típico	CL	60,2*	93,3	-	6,7	-	-	65,0	-	-	-	-
<i>cutaneum</i>	T15	aglom. de limo típico	CL	34,4	94,3	-	5,7	-	-	36,6	-	-	-	-
	T23	grânulos e sedim.	INT	37,9	-	-	-	-	100,0	15,0	-	-	-	8,3
	T37	aglom. de limo típico	CL	30,4	96,0	-	4,0	-	-	46,6	-	-	-	-
	T38	aglom. e sedim.	CL/INT	59,3	84,0	-	10,0	-	6,0	83,3	0,6	-	-	6,6
	T42	grânulos e sedim.	CL	24,9	33,3	-	40,0	16,7	10,0	75,0	5,0	-	-	-
	T46	aglom. de limo típico	CL	41,8	90,0	-	10,0	-	-	85,0	-	-	-	-
	T47	aglom. e sedim.	CL	50,7	97,6	-	2,4	-	-	97,0	-	-	-	-
	T69	grânulos e sedim.	CL/INT	29,6	100,0	-	-	-	-	71,6	-	-	-	-
	T75	sedimentos	INT	25,8	95,0	-	5,0	-	-	83,3	-	-	-	-
	T76	sedim. e aglom.	INT	14,9	81,7	-	18,3	-	-	21,6	-	-	-	-
	T87	aglom. de limo típico	INT	26,5	95,0	-	5,0	-	-	43,3	-	-	-	-
	T110	grânulos e sedim.	INT	50,3	83,3	-	8,4	-	8,3	80,0	-	-	-	-
	T115	sedimentos	CL	14,2	100,0	-	-	-	-	100,0	-	-	-	-
	T117	grânulos e sedim.	INT	19,7	80,0	-	20,0	-	-	100,0	-	-	-	6,6
	T124	grânulos	CL	38,3	56,6	-	43,4	-	-	93,3	-	-	-	-
	T128	aglom. e sedim.	INT	46,3	91,6	-	8,4	-	-	80,0	-	-	-	-
	T130	aglomerados	INT	40,5	100,0	-	-	-	-	30,0	-	-	-	-
	T137	aglomerados	INT	29,8	100,0	-	-	-	-	80,0	-	-	-	-
	T157	aglom. e sedim.	CL	30,9	100,0	-	-	-	-	10,0	-	-	-	-
	T165	aglomerados	CL	34,1	100,0	-	-	-	-	81,6	-	-	-	-
	T170	aglom. globosas	INT	10,7	100,0	-	-	-	-	3,3	3,3	-	-	-
	T173	limo típico compacto	CL	27,1	95,0	-	5,0	-	-	96,6	-	-	-	-
<i>T. fermentans</i>	T177	sedimentos	INT	26,9	-	-	-	70,0	30,0	80,0	-	-	-	80,0
<i>T. inkin</i>	T50	grânulos e sedim.	CL	70,9	2,3	-	-	-	97,7	50,0	4,0	-	-	2,3
<i>T. pullulans</i>	T26	grânulos e sedim.	CL	50,1	11,6	-	71,6	-	16,8	60,0	1,7	-	-	-
	T41	grânulos e sedim.	CL	35,0	0,5	-	4,5	95,0	-	37,5	-	-	-	6,6
	T44	aglom. de limo típico	CL	75,2	5,1	-	6,6	10,0	78,3	55,0	3,3	-	-	-
	T61	pouco sedimentos	INT	3,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T63	grânulos e sedim.	INT	34,1	3,3	-	35,0	11,7	50,0	85,0	1,6	-	-	-
	T125	grânulos	CL	36,2	5,0	-	-	-	95,0	100,0	-	-	-	70,0
	T127	aglomerados	CL	42,0	4,0	-	6,0	3,3	86,7	63,0	-	-	-	-
	T129	aglomerados	INT	61,8	3,7	-	9,6	3,3	83,4	65,0	-	-	-	-
	T145	aglomerados	INT	21,1	10,0	-	66,6	-	23,4	75,0	-	-	-	-
	T147	grânulos	INT	37,4	3,3	-	20,0	5,0	71,7	73,0	-	-	-	-
	T167	grânulos	INT	57,7	-	-	66,7	-	33,3	100,0	-	-	-	-
<i>Trichosporon</i> spp	T21	sedimentos	CL	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T35	sedimentos	CL	49,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,3
	T40	grânulos e sedim.	CL	87,5	90,0	-	10,0	-	-	60,0	-	-	-	-
	T45	grânulos e sedim.	CL	50,5	5,0	-	8,3	-	86,7	70,0	-	-	-	26,6
	T59	aglom. e sedim.	INT	30,3	11,7	-	30,0	-	58,3	60,0	1,6	-	-	-
	T60	grânulos e sedim.	INT	16,2	5,0	-	15,0	1,7	78,3	70,0	-	-	-	16,6
	T68	sedimentos	CL	42,8	100,0	-	-	-	-	100,0	-	-	-	-
	T82	grânulos e sedim.	CL	8,2	26,7	-	56,6	-	16,7	85,0	-	-	-	10,0
	T106	grânulos de limo típico	CL	29,9	23,6	-	20,0	-	56,4	63,0	-	-	-	-
	T107	aglom. e sedim.	INT	33,1	45,0	-	10,0	-	45,0	80,0	5,0	-	-	35,0
	T108	aglom. e sedim.	INT	35,0	40,0	-	20,0	-	40,0	90,0	-	-	-	-
	T109	grânulos e sedim.	INT	45,0	16,7	-	11,6	-	71,7	90,0	-	-	-	26,6
	T113	aglom. de limo típico	INT	11,9	3,7	-	4,7	-	96,6	4,0	-	-	-	-
	T114	grânulos	INT	12,1	-	-	-	-	100,0	100,0	5,0	-	-	93,3
	T118	sedimentos	CL	31,6	-	-	-	-	100,0	100,0	-	-	-	21,5
	T123	aglomerados	INT	42,9	6,7	-	5,0	-	88,3	70,0	-	-	-	-
	T126	grânulos	CL	42,4	1,7	-	1,7	-	96,6	95,0	3,3	-	-	86,6
	T136	aglom. e sedim.	INT	11,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20,0
	T140	aglom. e sedim.	INT	26,4	-	-	6,7	23,3	70,0	85,0	-	-	-	-
	T144	grânulos e aglom.	INT	62,5	4,7	-	5,0	-	90,3	75,0	2,0	-	-	-
	T148	grânulos	INT	30,6	5,0	-	6,7	-	80,3	65,0	-	-	-	-
	T149	aglom. e sedim.	INT	51,9	8,3	-	10,0	5,0	76,7	60,0	1,6	-	-	-
	T158	aglom. esfericos	CL	36,3	3,7	-	76,7	8,0	11,6	65,0	-	-	-	-

continua



QUADRO 7: Continuação

MICROORGANISMOS	TIPO CULTURAIS	AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA		PESO SÉCO (mg)	CARACTERIZAÇÃO					MICROSCÓPICA					
					FREQUÊNCIA DE		HIFAS (%)			ESPORULAÇÃO (%)		BACTÉRIAS		LEVEDURAS	
					A	B	C	D	E	F	G	H	I (%)	J (%)	
<i>Trichosporon</i> spp	T159	aglom. de limo típico	CL	41,2	8,3	-	66,7	11,7	13,3	50,0	-	-	-	-	
	T166	grânulos	INT	50,0	5,7	-	91,7	-	2,6	43,3	-	-	-	-	
	T168	aglom. de limo típico	INT	29,4	3,3	-	83,3	-	13,4	5,0	-	-	-	-	
	T175	aglom. de limo típico	INT	26,8	-	-	10,0	6,7	83,3	90,0	-	-	-	80,0	
	T176	grânulos	INT	40,5	36,7	-	55,0	-	8,3	80,0	-	-	-	-	
	T178	aglom. esfericos e sedim.	INT	48,6	5,0	-	76,7	-	18,3	76,6	-	-	-	-	
	T180	sedimentos	INT	3,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	
	T181	aglom. de limo típico	CL	59,7	13,3	-	80,0	-	6,7	80,0	-	-	-	-	
	T183	grânulos	INT	39,2	-	-	10,0	1,7	88,3	90,0	-	-	-	83,0	
<i>Candida curvata</i>	T5	aglom. esfericos	CL	85,7	54,3	-	46,7	-	-	100,0	-	-	-	3,3	
<i>Candida</i> spp	T100	sedim. grânulos	INT	19,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12,0	
	T164	aglo. esfericos	INT	43,5	1,7	-	3,3	90,0	5,0	30,0	3,3	-	-	43,3	
	T174	sedimentos	INT	19,8	-	-	-	36,7	63,3	-	-	-	-	50,0	
	T184	sedimentos	CL	21,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,3	
	T185	grânulos e sedim.	INT	23,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,6	
<i>Endomyconis bistora</i>	T24	grânulos e sedim.	CL	69,2	5,0	-	95,0	-	-	100,0	-	-	-	-	
<i>Endomyconis</i> sp	T49	aglomerados	CL/INT	50,9	5,0	-	5,0	-	90,0	85,0	5,0	-	-	20,0	
<i>Strobilomyces salmonicolor</i>	T138	sedimentos	INT	11,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	
<i>Cryptococcus</i> spp	T14	sedimentos	CL	46,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,0	
	T32	sedimentos	INT	29,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,0	
<i>Penicillium anatum</i>	T119	sedimentos	INT	5,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,0	
<i>Xylomyces fulvipes</i>	T7	aglom. e sedim.	INT	50,2	-	-	-	66,0	34,0	4,0	-	-	-	10,0	
<i>Xylophiala</i>	T22	sedimentos	INT	20,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,7	
<i>Xylophiala</i>	T141	aglom. esféricos	INT	20,8	-	-	-	91,7	8,3	-	-	-	-	30,0	
<i>X. parvianus</i>	T8	sedimentos	CL	18,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,7	
	T13	sedimentos	CL	59,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,0	
	T25	sedimentos	CL	23,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,0	
	T56	sedimentos	CL	28,6	-	-	-	-	100,0	100,0	-	-	-	85,7	
	T78	sedimentos	CL	15,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	35,0	
	T120	sedimentos	CL	8,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	
	T132	aglom. e sedim.	CL	24,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	66,7	
	T135	grânulos e sedim.	INT	15,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20,0	
	T154	aglom. irregul. esfericos	CL	29,9	5,0	-	45,0	-	50,0	80,0	-	-	-	-	
<i>Lophosporos</i>	T1	sedimentos	CL	27,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,3	
<i>L. vanuderi</i>	T4	sedimentos	CL	36,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,3	
	T27	sedimentos	CL	31,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,0	
	T150	sedimentos	CL	29,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,3	
	T153	sedimentos	INT	15,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,3	
<i>Xylomyces</i> spp	T33	aglom. e sedim.	ESC	54,2	-	-	-	-	100,0	-	-	-	-	33,0	
	T53	aglom. e sedim.	INT	13,9	-	-	-	-	100,0	100,0	6,7	-	-	93,0	
	T79	sedimentos	INT	9,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,3	
	T99	sedimentos	INT	35,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,0	
	T102	sedimentos	INT	13,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,3	
	T104	sedimentos	INT	16,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,7	
	T142	sedimentos	CL	14,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	
	T151	sedimentos	CL	38,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20,3	
	T152	sedimentos	CL	11,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	
	T155	aglom. e sedim.	INT	19,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	90,0	
	T179	sedimentos	INT	9,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,6	
	T182	sedimentos	INT	9,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	
<i>Ficinia</i> sp	T131	sedimentos	INT	4,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,0	
<i>Rhizoglyphus glutinis</i>	T70	sedimentos	INT	6,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,0	
<i>H. rubra</i>	T71	sedimentos	INT	15,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,3	
	T72	sedimentos	INT	32,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10,0	

continua

QUADRO 7: Continuação

MICROORGANISMOS	TIPOS CULTURALS	AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA		ÍESO S200 (Eg)	FREQÜENCIA DE			CARACTERIZAÇÃO DE			MICROSCÓPICA			
		MATERIAL FORMADO	TONALIDADE		A	B	C	RIFAS(%)	E	F	G	H	I(%)	J(%)
<i>Torulorhiza</i> sp	T54	sedimentos	INT	35,1	-	-	-	-	100,0	-	-	-	-	-
NÃO CLASSIFICADOS														
Leveduras não micelianas	T114	sedimentos	INT	10,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0
	T171	sedimentos	INT	10,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	27,3
	T172	sedimentos	INT	9,0	-	-	-	78,3	21,7	70,0	-	-	-	33,3
Leveduras pseudo-micelianas	T112	sedimentos	CL	26,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,0
	T143	sedimentos	CL	14,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,0
Leveduras micelianas	T2	sedimentos	CL	22,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3
	T58	grânulos e sedim.	INT	7,6	1,7	-	50,0	15,0	33,3	80,0	3,3	-	-	-
<i>Penicillium</i> spp	T9	aglom. esfericos	CL	43,7	8,0	-	8,3	3,3	80,4	-	8,7	-	-	-
	T10	aglom.esf.limo típico	CL	66,9	8,3	-	36,7	-	55,0	-	3,3	-	-	-
	T17	aglom. esfericos	CL	90,3	-	-	-	56,7	33,3	-	23,3	-	-	-
	T51	aglom. esfericos	CL	68,9	2,3	-	2,7	56,7	38,3	-	3,3	-	-	-
	T52	grânulos e sedim.	INT	2,0	-	-	-	-	100,0	-	51,7	-	-	-
	T55	aglom. esfericos	CL	41,8	-	-	-	76,7	23,3	-	-	-	-	-
	T64	sedimentação	INT	3,0	-	-	-	-	100,0	-	-	-	-	-
	T66	aglom.esf.limo típico	CL	32,4	3,3	-	-	40,0	56,7	-	-	-	-	-
	T73	aglom.esf. limo típico	INT	14,5	3,3	-	8,3	33,3	55,1	-	-	-	-	-
	T74	aglom.esf. limo típico	INT	13,5	1,7	-	5,0	38,3	55,0	-	1,7	-	-	-
	T81	grânulos e sedim.	INT	8,7	3,3	-	5,0	33,3	58,4	-	-	-	-	-
	T84	aglom. esf. e sedim.	CL	55,9	3,3	-	-	83,3	13,4	-	-	-	-	-
	T88	aglom.esf. limo típico	INT	12,4	8,3	-	6,7	30,0	55,0	-	-	-	-	-
	T89	aglom.esf. limo típico	INT	14,3	1,7	-	6,7	71,7	19,9	-	-	-	-	-
	T90	aglom.esf. limo típico	INT	19,1	5,0	-	6,7	60,0	28,3	-	-	-	-	-
	T91	aglom.esf. limo típico	INT	23,2	6,7	-	5,0	66,7	21,6	-	-	-	-	-
	T92	aglom.esf. limo típico	CL	59,0	3,3	-	8,3	50,0	38,4	-	-	-	-	-
	T93	aglom.esf. limo típico	CL	8,0	3,3	-	8,3	30,0	58,4	-	-	-	-	-
	T94	aglom.esf. limo típico	INT	39,7	10,0	-	10,0	36,7	43,3	-	-	-	-	-
	T95	aglom. e sedim.	INT	14,0	-	-	5,0	66,7	28,3	-	-	-	-	-
	T96	aglom. limo típico	INT	1,1	3,3	-	6,7	13,3	76,7	-	-	-	-	-
	T103	sedimentos	CL	46,2	-	-	1,7	86,7	11,6	-	-	-	-	-
	T116	aglom.esf. limo típico	INT	19,5	5,0	-	5,0	46,7	43,3	-	-	-	-	-
	T121	aglom. esfericos	INT	28,5	4,0	-	-	11,0	85,0	-	-	-	-	-
	T139	aglom. esf. limo típico	CL	28,6	-	-	-	76,7	23,3	-	-	-	-	-
	T146	aglom. esfericos	CL	60,4	-	-	5,0	23,3	71,7	-	10,0	-	-	-
	T156	aglom. e sedim.	CL	5,2	-	-	-	-	100,0	-	5,0	-	-	-
	T160	aglom.esf. limo típico	CL	65,5	5,0	-	5,0	83,3	6,7	-	-	-	-	-
	T161	sedimentos	CL	1,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T162	aglom.esf. limo típico	CL	55,2	-	-	-	43,3	56,7	-	-	-	-	-
	T163	aglom.esfericos	CL	54,7	-	-	-	18,3	81,7	-	-	-	-	-
	T169	aglom.esf. limo típico	CL	83,8	-	-	-	28,3	71,7	-	-	-	-	-
<i>Asteriillus niger</i>	T43	aglom. esfericos	CL	139,8	4,0	-	6,0	46,7	43,3	-	-	-	-	-
<i>Asteriillus</i> spp	T85	sedimentos	INT	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T86	sedimentos	INT	6,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T97	sedimentos	CL	1,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Beauveria</i> sp	T105	sedimentos	INT	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cochlosoma</i> spp	T67	grânulos e sedim.	INT	11,7	-	-	-	70,0	30,0	43,3	-	-	-	-
	T83	sedimentos	INT	27,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cladocarpium</i> sp	T18	sedimentos	CL	1,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cratium</i> sp	T48	aglom. esf. e sedim.	INT	51,3	-	-	-	-	100,0	-	-	-	-	-
<i>Isaria</i> sp	T65	sedimentos	INT	2,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mucor</i> sp	T77	sedimentos	INT	4,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Paecilomyces</i> spp	T34	aglom. esf. e sedim.	CL	7,4	10,0	-	6,7	11,7	71,6	-	1,7	-	-	-
	T39	aglom.esf. limo típico	CL	95,2	-	-	-	40,0	60,0	-	21,7	-	-	-
<i>Steccherinum</i> spp	T29	grânulos e sedim.	CL	24,4	11,7	-	-	1,3	87,0	-	-	-	-	-
	T30	aglom. esf. e sedim.	CL	1,7	12,3	-	-	-	87,7	-	-	-	-	-

continua

QUADRO 7: Continuação

MICROORGA NISMOS	TIPOS CULTU RAIS	AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA		FÉSO SÉCO (mg)	CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA									
		MATERIAL FORMADO	TONALIDADE		FREQUENCIA		DE HIPAS(%1)		ESPORULAÇÃO(%1)		BACTÉRIAS		LEVEDURAS	
					A	B	C	D	E	F	G	H	I(%2)	J(%2)
<i>Trichoderma</i> <i>viride</i>	T11	aglom. de limo típico	CL	98,5	30,0	-	6,7	23,3	40,0	-	33,3	-	-	-
	T36	aglom. de limo típico	CL	117,1	1,7	-	-	33,3	65,0	-	5,0	-	-	-
EULICETOS NÃO CLASSIFICADOS														
<i>Monileaceae</i> ( <i>Sporobolus</i> )														
	T186	aglom.esf. limo típico	INT	57,6	-	100,0	-	-	-	5,0	-	-	-	-
Não esporulan	T12	sedimentos	CL	20,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
tes	T19	sedimentos	CL	5,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T28	aglom. e sedim.	CL	6,0	-	-	-	20,0	80,0	-	5,0	-	-	-
	T98	sedimentos	INT	3,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T101	sedimentos	INT	2,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bactérias	T57	sedimentos	INT	1,4	-	-	-	-	-	-	-	-	4,0	-
	T62	sedimentos	INT	6,2	-	-	-	-	-	-	-	-	30,0	-
	T80	sedimentos	INT	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	-
	T111	sedim.limo gel.paredes	CL	6,5	-	-	-	-	-	-	-	**	93,3	-
	T122	aglom.limo gelatinoso	INT	17,3	-	-	-	-	-	-	-	**	95,0	-
	T133	aglom.limo gelatinoso	INT	14,9	-	-	-	-	-	-	-	-	83,3	-
TESTEMUNHAS														
1ª série	Limo Claro	aglom. de limo típico	INT	91,4	68,3	-	21,0	-	10,7	93,3	4,0	-	6,7	30,0
2ª série	Limo Claro	aglom. de limo típico	CL	40,5	20,0	-	23,3	43,3	13,4	55,0	5,0	-	10,0	8,3
3ª série	Limo Claro	aglom. de limo típico	INT	41,3	10,0	-	26,7	43,3	20,0	76,7	1,0	-	11,6	56,6

aglom. = aglomerados

sedim. = sedimentos

esf. = esféricos

\*\* = algumas pequenas cadeias de bacilos

CL = clara

INT = intermediária

ESC = escura

(%1) = em relação ao total das características A a E

(%2) = em relação à área total do campo microscópico

A = hifas de 7,8 µ de espessura, hialinas com septos em relevo;

B = hifas de 10,2 µ de espessura, sub-hialinas;

C = hifas de 4,4 µ de espessura, cilíndricas, hialinas;

D = hifas de 2,5 µ de espessura;

E = pseudo-hifas e outras hifas diferentes de A, B, C e D;

F = hifas formando artrosporos, blastoporos e outros esporos;

G = hifas formando clamidosporos;

H = bacilos em longas cadeias;

I = bacilos em aglomerados mucilaginosos;

J = leveduras em aglomerados mucilaginosos;

Quadro 8: Crescimento de 94 tipos culturais de microrganismos isolados do limo, em meio líquido de "água-servida".

Microrganismos	Tipos cult.	PESO SECO (mg)			Média
		R e p e t i ç õ e s			
		I	II	III	
<u>Trichosporon cutaneun</u>	T6	36,6	23,1	29,9	29,9
	T15	16,2	11,1	9,4	12,2
	T37	27,6	28,5	18,3	24,8
	T38	8,7	9,3	14,3	10,8
	T42	5,7	7,2	15,7	9,5
	T46	15,3	30,0	11,0	18,8
	T47	18,7	25,0	18,2	20,6
	T69	26,0	19,7	18,1	21,3
	T75	34,9	21,7	17,8	24,8
	T76	23,9	23,2	59,6	35,6
	T87	23,4	39,0	28,1	30,2
	T110	39,1	50,6	32,1	40,6
	T115	9,4	11,3	34,2	18,3
	T117	28,8	12,1	49,1	30,0
	T124	22,4	21,8	24,0	22,7
	T128	31,7	50,4	29,4	37,2
	T130	32,7	35,4	23,3	30,5
	T137	33,0	39,1	33,2	35,1
	T157	61,0	94,9	71,1	75,7
	T165	49,7	60,6	96,2	68,8
T170	17,7	17,3	11,0	15,3	
T173	40,1	23,2	24,0	29,1	
	Média p/ <u>T. cutaneun</u>	22			29,2abc*
<u>T. inkin</u>	T50	6,7	12,7	14,0	11,1
<u>T. pullulans</u>	T26	0,1	2,7	0,1	0,9
	T44	52,7	56,2	62,7	57,2
	T127	53,2	41,9	53,0	49,4
	T129	63,5	63,7	71,6	66,3
	T145	32,5	22,4	27,9	27,6
	T147	40,5	51,5	32,7	41,6
	T167	43,4	48,8	39,7	44,0
<u>Trichosporon spp</u>	T40	40,7	49,2	49,2	46,4
	T45	37,1	34,6	23,5	31,7
	T59	44,1	38,2	49,0	43,8
	T68	18,9	22,9	12,8	18,2
	T82	13,2	16,7	14,1	14,7
	T106	30,0	19,0	29,6	26,2
	T107	61,1	54,7	48,5	54,8
	T108	48,8	59,6	47,8	52,1
	T109	24,8	22,8	21,4	23,0
	T113	10,1	20,9	18,1	16,4
	T123	45,8	34,9	42,9	41,2
	T126	51,6	53,8	56,3	53,9

(continua)

Quadro 8: continuação

Microrganismos	Tipos cult.	PÊSO SECO (mg)			Média
		R e p e t i ç õ e s			
		I	II	III	
<u>Trichosporon</u> spp	T140	8,6	5,7	18,6	11,0
	T144	56,4	67,1	60,3	61,3
	T148	7,3	7,4	23,7	12,8
	T149	40,7	43,8	54,1	46,2
	T158	62,7	67,4	48,1	59,4
	T159	41,2	35,8	29,9	35,6
	T166	72,1	67,1	95,7	78,3
	T168	12,9	52,5	22,6	29,3
	T175	27,7	27,9	24,5	26,7
	T176	54,8	11,1	13,7	26,5
	T178	28,6	58,2	48,3	45,0
	T181	70,8	55,7	41,2	55,9
	T183	48,6	61,7	55,5	55,3
Média p/ outras spp de <u>Trichosporon</u>	33				38,1bcd
Média gen. <u>Trichosporon</u>	55				34,6bcd
<u>Candida curvata</u>	T5	58,4	48,8	34,9	47,4
<u>Candida</u> sp	T164	21,6	40,2	51,3	37,7
Média gen. <u>Candida</u>	2				42,5bcd
<u>Endomycopsis bispora</u>	T24	21,2	29,3	35,4	28,6
<u>Endomycopsis</u> sp	T49	35,9	18,2	16,6	23,6
Média gen. <u>Endomycopsis</u>	2				26,1ab
<u>Kluyveromyces bulgaricus</u>	T7	0,1	0,1	0,1	0,1
<u>K. marxianus</u>	T154	10,4	9,4	30,5	16,8
<u>K. drosophilae</u>	T141	19,8	14,2	30,0	21,3
<u>Kluyveromyces</u> sp	T33	111,0	112,7	107,2	110,3
Média gen. <u>Kluyveromyces</u>	4				37,1bcd
<u>Penicillium</u> spp	T9	53,7	45,8	76,2	58,6
	T10	44,9	54,1	39,3	46,1
	T17	76,3	64,0	95,5	78,6
	T51	68,2	53,2	52,7	58,0
	T55	47,5	35,2	44,2	42,3
	T66	40,7	60,1	63,2	54,7
	T73	14,2	14,5	26,4	18,4
	T74	32,7	35,6	26,0	31,4
	T84	46,4	135,1	88,2	89,9
	T88	12,7	22,9	17,5	17,7
	T89	27,2	18,4	14,1	19,9
	T90	37,4	34,7	56,7	42,9
	T91	99,1	90,7	103,0	97,6

(continua)

Quadro 8: continuação

Microrganismos	Tipos cult.	PESO SÊCO (mg)			Média
		R e p e t i ç õ e s			
		I	II	III	
<u>Penicillium</u> spp	T92	77,1	60,6	71,4	69,7
	T94	65,2	65,6	58,4	63,1
	T116	40,4	47,2	48,1	45,2
	T121	18,3	29,6	30,1	26,0
	T139	6,2	7,0	5,8	6,3
	T146	70,9	71,1	90,5	77,5
	T160	67,1	94,1	143,1	101,4
	T162	71,2	64,5	72,7	69,5
	T163	28,3	30,0	39,3	32,5
	T169	87,5	30,1	81,5	66,4
Média gen. <u>Penicillium</u>	23				52,8de
<u>Aspergillus niger</u>	T43	55,8	55,6	58,9	56,8de
<u>Graphium</u> sp	T48	40,1	89,7	98,7	76,2e
<u>Paecilomyces</u> spp	T34	44,9	11,5	44,7	33,7
	T39	68,8	68,3	76,2	71,1
Média gen. <u>Paecilomyces</u>	2				52,4cd
<u>Steccherinum</u> spp	T29	21,2	28,9	10,9	20,3
	T30	0,1	0,1	0,1	0,1
Média gen. <u>Steccherinum</u>	2				10,2a
<u>Trichoderma viride</u>	T11	57,9	56,1	49,9	54,6
	T36	57,0	63,4	53,1	57,8
Média	2				56,2de
M É D I A G E R A L	94				40,2

\* Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente ao nível de 5% (Teste de Tukey).

QUADRO 9: Determinação da temperatura inibitória e letal ao crescimento dos principais tipos culturais de microrganismos isolados do lino.

MICROORGANISMOS	TIPOS CULTURALS	TEMPERATURA INIBITÓRIA							TEMPERATURA LETAL (**)		
		TEMPERATURAS °C							De 40	De 45	De 50
		20	25	30	35	40	45	50	p/25°C	p/25°C	p/25°C
<u>Trichostereon cutaneum</u>	T6	23,75*	40,75	50,50	27,50	0,00	0,00	0,00	15,25	0,00	0,00
	T15	12,50	16,50	17,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	T37	31,00	42,75	60,75	34,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	T38	8,25	15,25	22,75	22,25	8,50	0,00	0,00	22,50	0,00	0,00
	T42	8,75	16,50	23,50	25,25	8,50	0,00	0,00	23,75	0,00	0,00
	T46	29,75	38,50	26,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	T47	26,25	41,50	56,50	45,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	T69	7,50	9,00	10,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	T75	26,00	37,25	33,00	1,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	T76	26,00	31,50	11,75	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	T87	28,00	39,00	26,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	T110	9,00	15,50	24,75	27,25	7,00	0,00	0,00	20,00	0,00	0,00
	T115	23,50	39,50	55,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	T117	37,25	38,00	6,45	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	T124	11,00	16,00	20,50	22,75	3,00	0,00	0,00	15,00	0,00	0,00
	T128	27,75	37,75	29,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	T130	26,50	35,25	24,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T137	28,50	42,75	56,50	51,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
T157	29,75	38,50	27,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
T165	28,50	34,25	32,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
T170	10,50	15,75	16,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
T173	17,00	25,25	37,00	21,75	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
Média	22	21,91	30,45	30,39	12,78	1,23	0,00	0,00	4,38	0,00	0,00
<u>T. inkin</u>	T50	9,50	14,50	20,50	21,00	4,25	0,00	0,00	15,25	0,00	0,00
<u>T. pullulans</u>	T44	22,75	26,00	34,25	16,50	0,00	0,00	0,00	19,50	0,00	0,00
<u>Trichostereon spp</u>	T40	11,75	22,50	23,50	23,75	7,75	0,00	0,00	20,75	0,00	0,00
	T68	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T82	9,00	14,00	22,50	25,25	5,75	0,00	0,00	18,75	0,00	0,00
	T106	5,25	11,75	15,75	6,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	T107	11,50	14,25	21,50	23,00	5,25	0,00	0,00	13,50	0,00	0,00
	T108	9,25	16,25	25,75	26,75	8,25	0,00	0,00	21,50	0,00	0,00
	T176	8,75	15,25	33,75	23,25	6,00	0,00	0,00	17,00	0,00	0,00
Média	8	10,97	16,81	24,69	20,75	4,66	0,00	0,00	15,78	0,00	0,00
p/o gen. <u>Trichostereon</u>	30	18,99	26,82	28,87	14,90	2,14	0,00	0,00	7,42	0,00	0,00
<u>Candida curvata</u>	T5	7,75	15,50	24,25	25,50	4,75	0,00	0,00	15,25	0,00	0,00
<u>Endogycopsis bispora</u>	T24	23,00	32,75	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
<u>Penicillium spp</u>	T10	22,25	25,75	7,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	T17	26,50	55,25	84,75	25,25	0,00	0,00	0,00	54,50	0,00	0,00
	T51	22,00	28,25	18,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	T169	15,50	26,75	21,25	8,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Média	4	21,56	34,00	33,00	8,37	0,00	0,00	0,00	13,62	0,00	0,00
<u>Aspergillus niger</u>	T43	17,50	34,50	50,00	46,25	8,25	0,00	0,00	51,50	0,00	0,00
<u>Faecillomyces sp</u>	T39	21,00	28,50	51,00	41,00	29,25	0,00	0,00	72,50	55,00	0,00
<u>Trichoderma viride</u>	T11	60,25	81,50	75,25	34,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
LINO CLARO	LC	27,00	35,00	44,50	4,00	2,50	0,00	0,00	36,00	0,00	0,00
MÉDIA GERAL	40	20,30	29,20	31,10	15,80	2,70	0,00	0,00	11,30	1,40	0,00

\* Diâmetro médio da colônia em mm, dados médios de 2 repetições

\*\* Reincubação a 25°C dos microrganismos previamente incubados às temperaturas de 40, 45 e 50°C

#### 4.5.2. Influência de produtos químicos biocidas ou biostáticos

Os dados originais de peso seco, deste ensaio são apresentados no Quadro IV do apêndice. A aplicação do teste F indicou efeitos altamente significativos entre tratamentos (produtos químicos), inóculos e uma interação entre ambos. O desdobramento de número de graus de liberdade desta interação e, a aplicação do teste de Tukey, propiciou os resultados ilustrados na Figura 10.



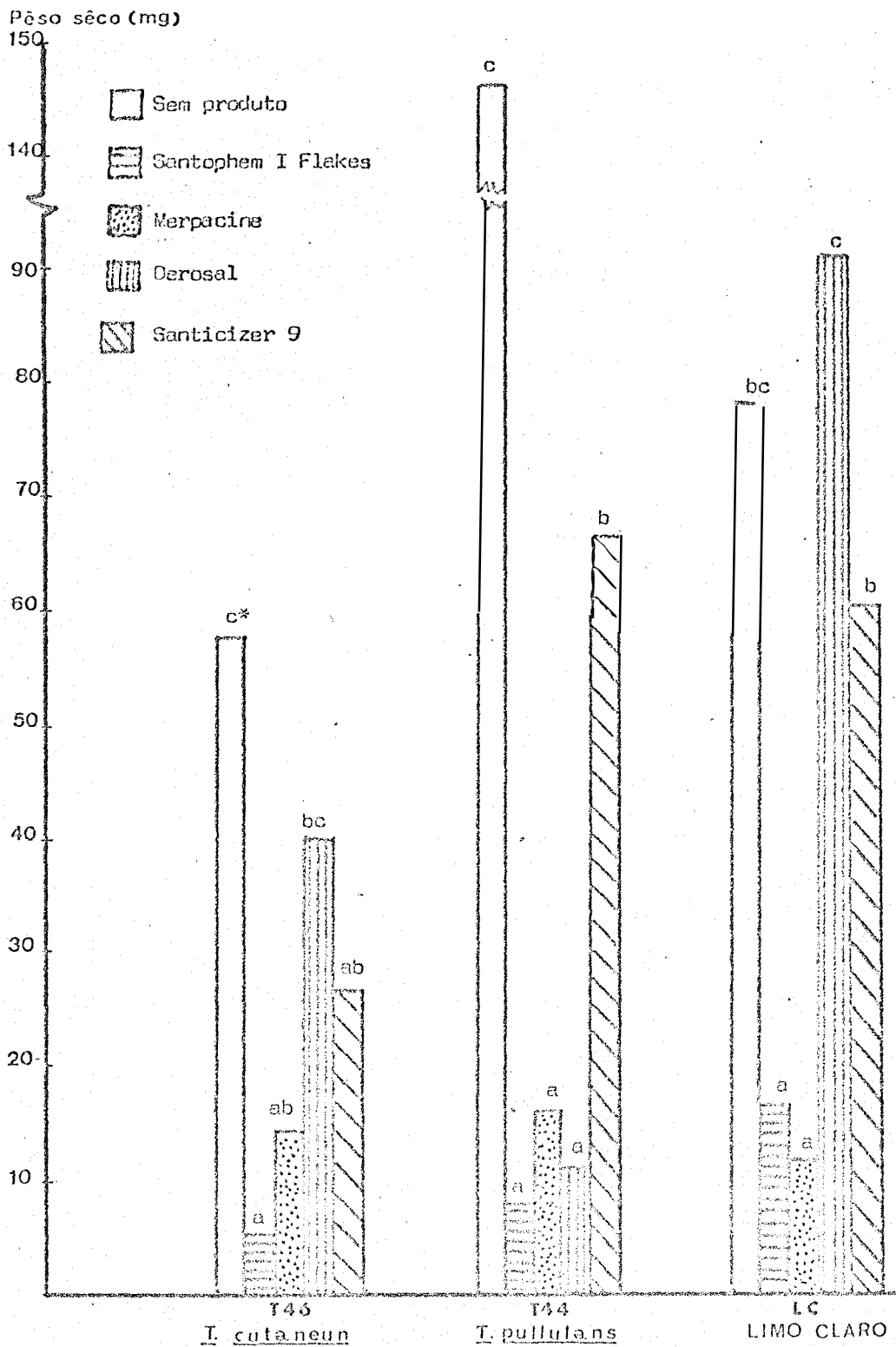


Figura 10: Influência de alguns produtos químicos no crescimento de microrganismos isolados do limo e de uma população natural de limo claro.

(\*) Para cada microrganismo, as colunas com letras iguais não diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade (teste T Tukey) - CV = 29,6%.

## 5 - DISCUSSÃO

No intuito de facilitar a compreensão dos resultados os princípios envolvidos no estudo das causas do problema e, o efeito de alguns agentes físicos e químicos no crescimento da flora microbiana dos materiais limosos, serão discutidos separadamente, em função dos objetivos propostos.

### 5.1.- Natureza da flora microbiana

Os resultados obtidos através da caracterização macroscópica de materiais limosos, coletados em vários locais de ocorrência e em duas épocas de amostragem, mostraram que a fração predominante do limo foi a de tonalidade intermediária entre as mais claras, quase transparentes e, as mais escuras ou negras (Quadro 1). Entretanto, relacionando-se as Figuras 1 e 2 com os dados do Quadro 1, nos locais mais abundantemente lavados (próximos aos bicos de água de lavagem das telas), a fração predominante foi o limo de tonalidade clara, enquanto que, nas paredes do tanque de "água servida" predominou o limo escuro. Na literatura consultada, não foram encontradas referências sobre a predominância de materiais limosos de aspectos diferentes, em relação aos locais de ocorrência nas indústrias de celulose e papel. Alguns autores (CASEY, 1960; DIEHM, 1969; EVELEIGH & BREWER, 1964a; e SANBORN, 1965), definiram as acumulações limosas de indústrias de celulose e papel de uma maneira geral, cuja descrição assemelha-se às estudadas neste trabalho, pelo menos nos estágios iniciais de sua formação. Os estágios finais coriáceos ou muito duros, citados por SANBORN (1965), não foram encontrados nas indústrias de chapas de fibras de madeira.

A separação dos materiais limosos por tonalidades, vi<sub>u</sub> sou observar possíveis variações na natureza da flora microbiana - considerando que determinadas tonalidades de limo predominaram em "habitats" diferentes (Quadro 1 e Figura 1). Embora os dados não possam ser conclusivos, uma vez que foram analisadas amostras compostas de cada tonalidade, os gêneros Kluyveromyces e Penicillium foram

isolados em maior frequência dos materiais limosos de tonalidades mais escuras (Quadro 5).

Por outro lado, os resultados das avaliações microscópicas das acumulações limosas (Quadros 2 e 3), denotaram que o limo é composto principalmente por hifas não esporulantes, em cuja trama miceliana prendem-se fibras, bactérias e leveduras (formando aglomerados mucilaginosos), e uma variedade de impurezas. Sob este aspecto geral, as observações de EVELEIGH & BREWER (1964a), obtidas no exame microscópico direto dos materiais limosos de indústrias de celulose e papel, concordam com as obtidas neste trabalho. Na literatura consultada, relativa ao assunto em pauta, EVELEIGH & BREWER (1964a) foram os únicos autores que se preocuparam em associar estruturas microscópicas aos materiais limosos, no estudo de problemas causados por populações microbianas complexas. Todavia, estudos mais aprofundados da frequência dos tipos de hifas e de outras estruturas microscópicas dos materiais limosos, conforme os dados transcritos neste trabalho, não foram encontrados na literatura consultada. A análise dos Quadros 2 e 3, permitiu apontar a estrutura hifálica A (hifas de  $7,8 \mu$  de espessura, hialinas, cilíndricas com septos em relêvo) como as hifas mais frequentes das acumulações limosas encontradas em indústrias de chapas de fibras da madeira, levando-se em conta a média geral, os diferentes locais de amostragem (com raras exceções) e, ainda, as diferentes tonalidades dos materiais limosos. Os dados transcritos no Quadro 7, excetuando-se a característica B, denotaram que os demais tipos de hifas podem ser formados por um mesmo microrganismo e que, um mesmo tipo de hifa pode ser formado por vários microrganismos. Fatores como temperatura, nutrientes, pH, aeração, teor de  $CO_2$  e outros, podem causar o dimorfismo em alguns fungos, principalmente no grupo das leveduras (COCHRANE, 1958). As estruturas A e C, apesar de sua semelhança, foram mantidas em separado com a finalidade de confrontar as características microscópicas do limo "in natura" com as características de crescimento "in vitro" dos microrganismos isolados do limo. Num sistema fechado, o acúmulo de metabólitos ou depleção de nutrientes poderia inibir a formação da característica A (hifas mais vigorosas), e favorecer a

formação de hifas semelhantes, mas de espessura mais fina (característica C). Por conseguinte, somente estudos mais acurados, envolvendo isolamentos dirigidos às demais estruturas hifálicas, poderiam permitir o agrupamento de algumas características, fato a ser levado em conta na continuação da pesquisa.

Com relação à tonalidade dos materiais limosos, os resultados dos Quadros 2 e 3, evidenciaram que os materiais mais escuros englobam maior quantidade de impurezas. Com efeito, o confronto do Quadro 1 com a Figura 1 mostra, conforme já discutido anteriormente, que os limos mais escuros formam-se geralmente em locais de menor lavagem ou que recebem maior quantidade de fibras e outros componentes da madeira, provenientes da lavagem das telas. As tonalidades mais escuras também poderiam ser devidas à maior oxidação dos materiais componentes do limo (SANBORN, 1965).

O isolamento de microrganismos, a partir de materiais limosos de indústrias de celulose e papel, tem sido conduzido através do método de diluições em série e plaqueamento em meios artificiais (CONKEY & CARLSON, 1963; COSTER, 1968; EVELEIGH & BREWER, 1964a e 1964b; POSTAGE, 1963; WANG, 1965), seletivos ou não, a determinados grupos de microrganismos. Neste trabalho, utilizou-se o meio natural de "água servida"-agar para todos os isolamentos de microrganismos dos materiais limosos bem como, na conservação das culturas puras em micoteca. Em ambos os princípios existem desvantagens: a utilização de meios artificiais, de composição muito rica e acentuadamente diversa das condições naturais, pode levar ao isolamento de microrganismos pouco envolvidos com o problema em estudo, e em contraposição, os meios naturais estão sempre sujeitos a flutuações de sua composição (ALEXANDER, 1961; COCHRANE, 1958; COSTER, 1968; STANIER e cols., 1969), o que torna extremamente difícil o estudo de floras microbianas complexas (POCHON & BARJAC, 1958). Os resultados obtidos por EVELEIGH & BREWER (1964a), confrontando a utilização de meios artificiais e meio natural de "água branca", no isolamento de microrganismos de acumulações limosas de indústrias de celulose e papel, mostraram que esses meios foram similares no tocanto

te aos tipos de microrganismos isolados, exceto pelo maior número de bactérias isoladas em meio natural. Os resultados de EVELEIGH & BREWER (1964a) poderiam, entretanto, constituir-se numa evidência da importância das bactérias nas formações limosas das indústrias de celulose e papel, tal como aventaram Nason & cols., 1940, e Stracham, 1947, citados por EVELEIGH & BREWER (1964a), BECKWITH (1931) e SANBORN (1965), fato não constatado no presente trabalho, onde as bactérias ocorreram com apenas 1,8% de frequência, a despeito de utilizar-se o meio natural de "água servida". Finalmente, levando-se em conta o conceito de meios enriquecidos, segundo STANIER e cols. (1969), i.é, meios em que determinados requisitos nutricionais de um microrganismo ou grupos de microrganismos são deliberadamente favorecidos, o meio natural (no caso a "água servida") certamente deve conter propriedades nutricionais seletivas, que determinam o estabelecimento da flora limosa em seu "habitat", inimitáveis por qualquer meio artificial (POCHON & BARJAC, 1958).

Os resultados das análises de população das acumulações limosas (Quadro 4), denotaram acentuadas e inconstantes variações entre as diferentes tonalidades de limo e no decorrer das épocas de amostragem. A exemplo dos resultados obtidos por EVELEIGH & BREWER (1964a) e WANG (1965), a inconstância nos dados da análise da população poderia ser atribuída a numerosos fatores como locais de amostragem na indústria, controle de operações dos sistemas industriais, estações do ano, temperatura dos "habitats" de formação limosa, tipo e qualidade do polpa, pH, oxigenação e muitos outros discutidos por CASEY (1969), DIEHM (1969), SANBORN (1965) e TORGESSION (1967) que, em suma, traduzem as frequentes mudanças das condições ambientais da indústria.

O estudo da natureza da microflora limosa, efetuado através do isolamento de microrganismos pelos métodos de diluições em série e, isolamentos dirigidos às hifas mais frequentemente encontradas nas acumulações limosas (Quadros 5 e 6), denotaram que a flora microbiana do limo é constituída predominantemente por fungos relacionados às leveduras micelianas. Dentre estes, Trichosporon -

cutaneun (de Beurm., Gougerot et Vaucher) Ota foi isolado em maior frequência (25,3% do total), seguido de outras espécies do gênero Trichosporon não identificadas. Dentre as leveduras não micelianas várias espécies do gênero Kluyveromyces apresentaram, somadas, a mesma frequência do gênero Trichosporon. Várias espécies não identificadas do gênero Penicillium foram, entre os fungos propriamente ditos, isoladas em maior frequência. O confronto destes resultados com os obtidos por WANG (1965), apresenta certas discordâncias quanto às frequências de microrganismos isolados de amostras de polpa e papel pelas quais, o gênero Trichosporon é apontado como infrequente e, vários gêneros de Deuteromicetos (Alternaria, Aspergillus, Penicillium e outros), foram os mais frequentemente isolados. Por outro lado, várias espécies dos gêneros Geotrichum, Oidium, Monilia, Oospora e Sporotrichum, isolados em elevada frequência por EVELEIGH & BREWER (1964a e 1964b), SANBORN (1933, 1944 e 1965) e WANG (1965), não passam de uma sinonímia de Trichosporon cutaneun, segundo LODDER, (1970). Se a toda esta discussão somar-se os resultados de frequência, obtidos por EVELEIGH & BREWER (1964a), nos isolamentos de uma série de amostras de indústrias de celulose e papel dos Estados Unidos, e ainda, a possibilidade de que o tipo cultural T186, isolado neste trabalho, seja uma espécie do gênero Sporotrichum (Trichosporon cutaneun, segundo LODDER, 1970), poder-se-ia supor que a microflora encontrada naquelas indústrias apresenta muita semelhança com a flora limosa de indústrias de chapas de fibras da madeira.

Na literatura consultada, vários autores (Nason & cols., 1940 e Stracham, 1947, citados por EVELEIGH & BREWER, 1964), apontaram as bactérias como as principais responsáveis pelas acumulações limosas de indústrias de celulose e papel. Outros autores, chegaram inclusive a estudar formações extracelulares (cápsulas), de alguns gêneros de bactérias, como os materiais responsáveis pelo aspecto viscoso do limo (BECKWITH, 1931; CASEY, 1960; DELAPORT & VLASSOF, 1960; SANBORN, 1965). Além disso, vários gêneros de bactérias (transcritos na Revisão Bibliográfica), foram frequentemente isolados por CONKEY & CARLSON (1962 e 1963), COSTER (1968), EVELEIGH &

BREWER, (1964a), SANBORN (1933, 1944 e 1965) e WOLFSON & MICHALSKI (1964), de materiais limosos de indústrias de celulose e papel. Neste trabalho, ainda que os resultados dos isolamentos (Quadro 5) situem as bactérias com apenas 1,8% de frequência, os resultados das caracterizações microscópicas (Quadros 2 e 3) mostraram que, em alguns locais de amostragem e para materiais limosos de coloração clara, ocorreram quantidades apreciáveis de bactérias, formando cadeias de bacilos e aglomerados mucilaginosos, fato que merece maior ênfase na continuação desta pesquisa.

Na literatura consultada, não foram encontradas citações a respeito de outros métodos de isolamento mais dirigidos às estruturas microscópicas de maior frequência nos materiais limosos, tal como os isolamentos dirigidos às hifas mais frequentes do limo, utilizados no presente trabalho. Os resultados de frequência, obtidos nestes isolamentos (Quadro 6) vieram ratificar a estreita associação de Trichosporon cutaneum com as acumulações limosas de indústria de chapas de fibras, corroborando com os resultados obtidos pelo método de diluições em série; sabidamente seletivo a microrganismos esporulantes (ALEXANDER, 1971; JOHNSON e cols., 1959; STANIER e cols, 1969) e, a despeito da quebra sensível de viabilidade das estruturas hifálicas durante o processo de homogeneização das amostras, conforme observou EVELEIGH & BREWER (1964a). Esta última observação, pode explicar também o número elevado de perdas nos isolamentos dirigidos às hifas, provavelmente devido às lavagens sucessivas dos materiais limosos.

A utilização de técnicas de micro-manipulação para estudar o desenvolvimento e reprodução de fragmentos das hifas mais frequentes dos materiais limosos e, do isolado dirigido (T46) de Trichosporon cutaneum, possibilitaram visualizar as formas reprodutivas da característica microscópica A do limo "in natura" em condições de laboratório e, assim, correlacionar essas estruturas com as obtidas durante as operações de cultivo "in vitro" dos microrganismos isolados do limo. O confronto das Figuras 5 e 6 (h'bitos vegetativos e reprodutivos das hifas espessas "A" do limo), com a Figura 7 (Tri-

chosporon cutaneun - T46), evidenciou toda a similaridade entre este organismo e as referidas hifas, ratificando sua estreita associação na complexa flora limosa das indústrias de chapas de fibras da madeira.

Finalmente, as características do crescimento "in vitro" dos tipos culturais de microrganismos isolados das acumulações limosas (Quadro 7), ratificaram uma vez mais a associação de Trichosporon cutaneun à flora limosa estudada neste trabalho, uma vez que a maioria dos tipos culturais desse microrganismo, reproduziu as hifas mais frequentemente encontradas no limo "in natura".

A escolha do método de cultivo "in vitro" dos microrganismos do limo, ainda que discordante das opiniões de COSTER (1968), segundo as quais o meio teste deve ser invariável, concordou com CONKEY & CARLSON (1962) quando se visa o estudo da flora microbiana do limo e seu controle, nas condições específicas de cada indústria. As considerações feitas por CASEY (1960), também foram levadas em conta para a escolha do método utilizado neste trabalho. Os resultados apresentados no Quadro 8, denotaram que os gêneros Penicillium, Aspergillus, Graphium, Paecilomyces e Trichoderma foram os que mais se adaptaram ao sistema de cultivo artificial, utilizado neste trabalho. Este fato confirma a dificuldade da escolha de um método que invariavelmente se aproxime das condições naturais, conforme sugerido por COSTER (1968) e discutido por CASEY (1960) e CONKEY & CARLSON (1962). Deve-se ressaltar ainda, que o método idealizado por COSTER (1968), apesar de utilizar um meio artificial simulando a "água branca" (portanto, menos sujeito a variações nutricionais), não passa de um sistema fechado, onde a exaustão de nutrientes e o acúmulo de metabólitos tóxicos, certamente favorece determinados microrganismos de uma flora, na dependência do rendimento de seus processos de vinculação energética ou de sua resistência aos metabólitos auto-inibidores (ALEXANDER, 1961; COCHRANE, 1958; PELCZAR & REID, 1965; STANIER e cols., 1969; POCHON & BARJAC, 1958). A utilização de populações mistas, tal como o inóculo de hifas do limo claro previamente lavado (Quadro 7), evidencia ainda mais este pro-



blema considerando a inconstância da frequência dos tipos de hifas formadas em sistemas artificiais de cultivo, em confronto com o limo "in natura" (Quadros 2 e 3). Os estudos de EVELEIGH & BREWER (1964b e 1965) bem como, os mecanismos de associações gerais de microrganismos discutidos por MARSHALL (1915) e POCHON & BARJAC (1958), podem elucidar as dificuldades encontradas na reprodução "in vitro" de fenômenos causados por populações complexas, a partir de inóculos naturais.

Pelos resultados obtidos na determinação da época - mais apropriada à coleta dos ensaios (Figura 8), o 7º dia de incubação seria mais indicado para inóculos constituídos de populações naturais. Por outro lado, a "água servida" enriquecida com glucose, manteve o crescimento de Trichosporon pullulans até o 14º dia, fato explicável pela ausência de competição (POCHON & BARJAC, 1958). Entretanto, nos biotestes com a utilização de produtos químicos, manteve-se o período de incubação de 10 dias, pelo fato de envolver tratamentos inoculados com populações naturais. A tendência à diminuição do peso seco (Figura 8), encontrada para a maioria dos tratamentos ao 14º dia de incubação, pode ser explicada pelo fenômeno da autólise, segundo STANIER e cols., (1969).

Aventou-se também a hipótese de que as variações do potencial de inóculo, decorrentes do método de inoculação por blocos de cultura, não afetariam o peso seco final dos tratamentos, com base nos princípios do crescimento e morte de microrganismo (PELCZAR & REID, 1965; STANIER e cols., 1969). A análise da Figura 9 evidenciou que, somente diferenças de potenciais de inóculo da ordem milhões de unidades reprodutivas, podem afetar o peso seco ao final do período de incubação (7 dias). Como o tempo de geração dos microrganismos é geralmente pequeno, o crescimento exponencial atingiria níveis tão elevados que ao final do 7º dia de incubação, mesmo partindo de poucos esporos viáveis (3,6 esporos para Trichoderma viride - T11), o volume da matéria viva poderia exaurir os nutrientes ou auto inibir-se pelo acúmulo de metabólitos tóxicos (STANIER e cols., 1969). Destas considerações, pode-se supor que o elevado coeficiente

de variação, obtido no cultivo de microrganismos e materiais limosos "in vitro", seria devido, principalmente, ao método de avaliação do crescimento (peso seco retido no papel de filtro). Todavia, face aos resultados apresentados na Figura 9, a padronização da concentração do inóculo deverá ser efetuada sempre que possível o que, certamente, contribuirá para reduzir o erro experimental.

## 5.2. Influência de agentes físicos e químicos no crescimento dos microrganismos do limo

Segundo CASEY (1960), a opção de controle realmente empregada nas indústrias de celulose e papel é o controle através de toxicantes e, a elevação da temperatura (vapor e água quente), tem sido utilizada nas operações de limpeza para redução do potencial de inóculo.

Os resultados apresentados no Quadro 9, onde se estudou a influência da temperatura no crescimento e morte dos principais tipos culturais de microrganismos isolados dos materiais limosos bem como, de uma população natural do limo, mostrou que, tanto as culturas puras quanto a população natural, foram inibidas a 45°C. Por outro lado, a temperatura de 40°C foi letal a alguns inóculos, a de 45°C foi letal a 97,4% e, a de 50°C, foi letal a todos os inóculos. Estes resultados sugerem que, pelo menos nas condições atuais, não existem microrganismos termófilos pelo conceito de COCHRANE (1958). Por outro lado, deve ser lembrado que a morte de microrganismos pela aplicação contínua e prolongada das temperaturas mais altas, não preenche o senso estrito de "ponto letal" (COCHRANE, 1958) e que apesar de não terem sido constatados os microrganismos termófilos, não pode ser excluída a possibilidade de uma pressão de seleção para que alguns microrganismos da flora microbiana, tornem-se adaptados a temperaturas mais elevadas, durante os programas de controle (COCHRANE, 1958 e STANIER e cols., 1969).

Alguns tipos culturais de Trichosporon cutaneum, Penicillium spp, Trichoderma viride e Endomycopsis bispora, evidencia

ram uma temperatura ótima de crescimento em torno de 25°C (Quadro 9). Embora não sejam considerados psicrofílos, em comparação com os resultados obtidos por EVELEIGH & BREWER (1964a), a baixa temperatura ótima de crescimento poderá significar enormes esperanças na utilização da elevação da temperatura (aquecimento de água de lavagem das telas ou aplicações de choques de vapor), para o controle da flora microbiana do limo das indústrias de chapas de fibras da madeira.

A hipótese de controle da flora limosa, através da utilização de agentes biocidas ou biostáticos foi confirmada através dos resultados ilustrados na Figura 10. Dentre os produtos testados, o Santophen I equivaleu-se ao Merpacine (mercurial orgânico), controlando Trichosporon cutaneun, T. pullulans e a população natural do limo. Resultados semelhantes foram obtidos por CONKEY & CARLSON (1963), para alguns microrganismos da flora limosa de indústrias de celulose e papel.

Considerando a possível propriedade corrosiva dos produtos mercuriais, ainda que não tenha sido discutida por CASEY (1960), DIEHM (1969) e SANBORN (1965), provavelmente pelas baixas dosagens recomendadas, o Merpacine foi incluído neste trabalho apenas para servir como testemunha de um agente de poder biocida, já que a sua utilização na prática dependeria de estudos para evitar-se a poluição (TORGESSION, 1967). Por outro lado o Santicizer-9 e o Derosal não controlaram a flora limosa e apresentaram efeitos inversos no controle de T. cutaneun e T. pullulans, quando confrontados entre si (Figura 10). Este fato encontra fundamentos nas discussões de CASEY (1960), pois a morte ou inibição de um grupo de microrganismos pode redundar no crescimento de outros, não afetados pelo toxicante, mas que eram inibidos pelos primeiros. Os fundamentos de MARSHALL (1915) e POCHON & BARJAC (1958), sobre as leis que regem o equilíbrio biológico, podem também explicar este fenômeno que deverá ser sempre levado em consideração, na escolha do biocida industrial ou em qualquer programa de controle, fato que não está bem esclarecido na literatura consultada, onde os biotestes são normalmente dirigidos a microrganismos em cultura pura (CONKEY & CARLSON, 1963; COSTER

1968). O método utilizado neste trabalho, para testar "in vitro" as propriedades biostáticas ou biocidas de toxicantes, embora não satisfaça todos os requisitos levantados por COSTER (1968), conforme discutido anteriormente, foi considerado importante para aquilatar a estabilidade dos produtos em "água servida", cuja acidez e a possível presença de substâncias oxidantes, poderia afetar o princípio ativo ou sua solubilidade, conforme TORGESSION (1963), THOMSON (1973) e outras informações contidas nos Boletins Técnicos das firmas produtoras de toxicantes (MONSANTO Tech.Bull nºs O/PS-2, O/PL-0, SC-6 - IC/PS-8, Q-444 B-1; HOECHST, Bull HOE 17411 OF).

Por outro lado, a resistência de microrganismos aos toxicantes, abordada com frequência na literatura (CASEY, 1960; STANIER e cols., 1969; TORGESSION, 1967), tem um exemplo marcante nas instalações da DURATEX S.A. Indústria e Comércio, onde é incorporado o Pentaclorofenol aos sistemas de recirculação da "água servida", desde longa data. Este fato, mostra a necessidade de se ter vários toxicantes eficientes no controle da flora limosa, para que haja a possibilidade de aplicá-los alternadamente, evitando-se a pressão de seleção às linhagens tolerantes.

Finalmente, conforme discutido por CASEY (1960) nenhum programa de controle poderá surtir efeitos satisfatórios, sem a limpeza e desinfecção prévia de todo o sistema industrial, visando reduzir o potencial de inóculo e evitar a auto proteção das camadas mais internas das acumulações limosas.

## 6 - RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho visou estudar a natureza da flora microbiana das acumulações limosas, de indústrias de chapas de fibras da madeira e, apresentar subsídios ao seu controle.

O estudo das causas do problema envolveu a caracterização, macro e microscópica, dos materiais limosos; o isolamento de microrganismos em cultura pura, pelos métodos de diluições em série e isolamentos dirigidos às hifas mais frequentes do limo; o estudo dos hábitos vegetativos e reprodutivos das hifas mais frequentes do limo; e, o confronto das características de crescimento "in vitro", dos microrganismos isolados do limo, com as principais características do limo "in natura". Em todos os isolamentos, conservação e manutenção das culturas, cultivo dos microrganismos "in vitro" e biotestes, utilizou-se o meio natural de "água servida".

Pelos resultados obtidos, foram extraídas as seguintes conclusões:

1. As acumulações limosas de indústrias de chapas de fibras da madeira são constituídas, essencialmente, de uma trama miceliana à qual agregam-se bactérias e leveduras em aglomerados mucilaginosos, fibras e uma variedade de impurezas.

2. De maneira geral, as estruturas hifálicas mais frequentemente associadas com os materiais limosos, foram hifas hialinas, com septos em relêvo e espessura média de 7,8  $\mu$ .

3. A natureza da flora microbiana do limo mostrou-se complexa tendo sido isoladas, em maior frequência, várias espécies dos gêneros Trichosporon, Kluyveromyces e Penicillium e, em menor frequência, uma série de Deuteromicetos, leveduras e algumas bactérias não identificadas.

4. Trichosporon cutaneum mostrou-se estreitamente associado às acumulações limosas, uma vez que: ocorreu sempre em maior frequência nos isolamentos; e, suas características de cres

cimento "in vitro" foram análogas as principais características do limo "in natura".

5. Não foram constatados microrganismos termófilos na flora microbiana do limo, tendo sido inibidos "in vitro" por incubação contínua a 45°C.

6. O Santophen I (O-benzil-P-clorofenol), a 80 ppm do P.A., e o Merpacine (fenil acetado de mercúrio), a 10 ppm do P.A., inibiram o crescimento "in vitro" da flora microbiana das acumulações limosas.

## 7. SUMMARY

The purpose of the present work was to study the nature of the microbial population of slime accumulations in fiberboard industries, as well as to suggest alternatives to its control.

The diagnosis of the problem involved: a) macro and microscopic characterization of slime accumulations; b) isolation of microorganisms in pure culture by the dilution plate method and direct isolation of the most frequent hyphae in the slime; c) a study of the vegetative and reproductive habits of the most frequent hyphae in the slime; and d) a comparison of the characteristics of slime microorganisms growth "in vitro" with the main characteristics of the slime accumulation "in natura". Isolation, slime microorganisms growth "in vitro", and biotest, as well as conservation of isolates in pure culture were carried on using waste water as natural means.

From the results obtained the following conclusions could be drawn:

1. The slime accumulations were essentially formed by mycelial mats to which fibers and other wood constituents, impurities, bacterias and yeasts were aggregated, forming mucilaginous agglomerates.

2. The most frequent microscopic characteristic in slime accumulation were the hyphae hyalines, with well defined septa and  $7.8 \mu$  in diameter.

3. The microbial population of the slime showed to be very complex. Several species of the genera Trichosporon, Kluyveromyces and Penicillium were most frequently isolated and a series of Deuteromycetes, yeasts and a few unidentified bacteria were less frequent.

4. Trichosporon cutaneum was closely related to slime accumulation once it was the most frequently isolated organism; and its growth characteristics "in vitro" were analogous to the main ones of the slime "in natura".

5. Thermophilic microorganisms were not found in slime microbial population, once a continuous "in vitro" incubation under 45<sup>0</sup>C inhibited them.

6. The Santophen I (O-benzyl-P-chlorophenol) at 80 ppm of a.i., and Merpacine (mercuric phenyl acetate) at 10 ppm of a.i., inhibited the microbial population growth of slime accumulation "in vitro".



8. BIBLIOGRAFIA CITADA (\*)

- ALEXANDER, A. 1961. Introduction to soil microbiology. John Wiley and Sons Inc. New York, 467 p.
- ALEXOPOULOS, C.J. 1966. Introductory mycology. John Wiley & Sons, Inc., New York - London - Sydney, 613 p.
- ALPER, N. 1960. Paper manufacture under near sterile conditions. Tappi, N.Y., 43(2): 181A-183A.
- ASSARSSON, A. 1969. Reactions during chip storage and how to control them. Pulp Pap.Mag.Can., 70(18): T323-T328. (Chem.Abstr. 71: 12170q).
- BARNET, H.L. 1960. Illustrated genera of imperfect fungi. Burgess Publishing Co. (2ª ed.), Minneapolis, Minn., 225 p.
- BENIGNUS, P.G. 1948. Copper 8-quinolinolate industrial preservative. Ind. Engng. Chem.analyt. Edn., Easton. Pa., 40(8):1426-1429.
- BECKWITH, T.D. 1931. The bacteriology of pulp slime. J. Bact., Baltimore, 22: 15-22.
- BREWER, D. 1958. Studies on slime accumulation in pulp and paper mills. I. Some fungi isolated from mills in New Brunswick and Newfoundland. Can.J.Bot., Ottawa, 36(6): 941-946.
- CASEY, J.P. 1960. Pulp and Paper: chemistry and chemical technology. Interscience Publishers, Inc. New York (2ª ed.), Vol II, - 668+1147 p.
- COCHRANE, V.W. 1958. Physiology of fungi. John Wiley & Sons, Inc. New York. 524 p.
- CONKEY, J.H. & J.A.CARLSON. 1962. An examination of Methods for testing biostatic Agents. Tappi, N.Y., 45(6): 514-523.
- \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. 1963. Relative toxicity of biostatic agents suggested for use in the Pulp and Paper Industry. Tappi, N.Y., 46(5): 23A-39A.
- COSTER, E. 1968. The slime problem in the paper industry caused by micro-organisms. Appita, Sydney, 21(4): 132-138.

(\*) Abreviaturas de acôrdo com "World List of Scientific Periodicals: 1900-1960". London, Butterworths, (4th ed.), 1963-1965. 3 vol.

- DELAPORTE, A.V. & L.T. VLASSOF. 1960. Fresh water quality -its effect on product quality in the pulp and paper industry. II. Some biological aspects of water quality. Tappi, N.Y., 43(2): 189A-191A.
- DIEHM, R.A. 1969. Microbiologia de la Pulpa y del Papel. (IN LIBBY, C.E. 1969. Ciencia y tecnologia sobre pulpa y papel. Tomo II: Papel. Comp.Editorial Continental, S.A. Mexico, Espanha, Argentina e Chile, (2ª ed.) 514 p.
- EVELEIGH, D.E. & D. BREWER. 1964a. Ecological observations on the fungi and bacteria in slime accumulations in a paper mill. Can. J.Bot., Ottawa, 42(1): 35-43.
- \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. 1964b. Nutritional requirements of the microflora of a slime accumulation in a paper mill. Can.J.Bot., Ottawa, 42(4): 341-350.
- \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. 1965. Interrelationships between microorganisms in an accumulation of slime in a paper mill. Can.J.Bot., Ottawa, 43: 519-526.
- GREAVES, H. 1971. The bacterial factor in wood decay. Wood Sci. Technol., N.Y., 5(1): 6-16 (For.Abstr. 33(4): 7054).
- HACKETT, W.J. 1967. Germicidal cleaners and anti-bacterial cleaning Detergent Age (Nov.): 68-70.
- \_\_\_\_\_, 1968. Germicidal cleaners and anti-bacterial cleaning. Detergent Age (Jan.): 85, 86 e 98.
- HARRIS, E.E.; M.L. HANNAN; R.R. MARQUARDT & J.L.BUBL. 1948a. Fermentation of wood hydrolyzates by Torula utilis. Ind. Engng.Chem. analyt.Edn., Easton Pa., 40(7): 1216-1220.
- HARRIS, E.E.; J.F. SAEMAN; R.R.MARQUARDT; M.L.HANNAN & S.C.ROGERS. 1948b. Fodder yeast from wood hydrolyzates and still residues. Ind.Engng.Chem.analyt.Edn. Easton Pa., 40(7): 1220-1223.
- HILL, E.C. 1971. Choosing an industrial biocide. Process Biochem., London, 6(11):17-18, 34.
- HODGMAN, C.D.; C.R.WEAST; R.S.SHANKLAND & S.M.SELBY. 1962. Handbook of Chemistry and Physics. The Chemical Rubber Publishing Co., - Cleveland, Ohio (43ª ed), 3.513 p.

- HOECHST Boletim HOE 174110F. Derosal - Dados técnicos e Instruções preliminares para el uso (1973). 8 p. (mimeografado).
- JOHNSON, L.F.; E.A.CURL; J.H.BOND & H.A.FRIBOURG. 1959. Methods for studying soil microflora-plant disease relationships. Burgess Publ.Comp. Minneapolis, Minn., 178 p.
- KNUT, D.T. 1964. Bacteria associated with wood products and their effects on certain chemical and physical properties of wood. Abstr. of thesis, in Dissert.Abstr., 25(4): 2175. (For.Abstr., 26(4): 5935).
- LAGARDE, E. 1961. Étude du pouvoir bactériostatique et bactéricide de quelques composés vis-a-vis de une souche pure de bactéries sulfato-réductrices. Annls. Inst. Pasteur, Paris, T100(3): 368-376.
- LACAZ, C.S.; P.S.MINAMI & A.PURCHIO. 1970. O grande mundo dos fungos. Edit. U.S.P. e Poligno. 255 p.
- LODDER, J. 1970. The Yeasts: a taxonomic study. North-Holland Publis.Comp., Amsterdam-London, 1385 p.
- MARSH, P.B. G.A.GREATHOUSE; K.BOLLENBACKER & M.L.BUTLER. 1944. Copper soaps as rot-proofing agents on fabrics. Ind.Engng.Chem. analyt.Edn., Easton Pa., 36(2): 176-181.
- MARSHALL, C.E. 1915. Microbial associations. Science, N.Y., 41(1052): 306:312.
- MARTIN, R.B. 1957. Sterelization and Deodorization. IN: Water technology in the pulp and paper industry. Tech.Ass.Pulp Pap.Ind., N.Y., Tappi Monogr. Ser. nº 18, 170 p.
- MERRIL, W. & D.W.FRENCH. 1964. Decay of wood by Alternaria and Penicillium. Phytopathology, Lancaster, Pa. 54(7): 867-868.
- \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. 1966. Decay in wood and wood fiber products by Sporotrichum pruinosum. Micologia, 58(4): 592-596.
- MONSANTO Tech.Bull. Nº 0/PS-2. Santobrite - micro-organism control in the pulp and paper industry. 7 p. (impresso).
- MONSANTO Tech.Bull. Nº 0/PL-9. Santicizer-9 - Solid Processing Aid and Reactive Plasticizer. 11 p. (impresso).

- MONSANTO Tech.Bull. Nº SC-6. Santobrite control for slime and algae (1963). 7 p. (impresso).
- MONSANTO Tech. Bull. Nº IC/PS-8. Monsanto Penta - pentachlorophenol-technical. 19 p. (impresso).
- MONSANTO Tech.Bull. Nº Q-444B-1. An independent test report on Santophen 1, Monsanto's "Broad Spectrum" germicide. 4 p. (mimeografado).
- PELCZAR, M.J.Jr. & R.D.REID. 1965. Microbiology. McGraw-Hill, Inc. (2ª ed), 662 p.
- POCHON, J. & H. BARJAC. 1958. Traté de microbiologie des sols: Applications agronomiques. Dunod Ed., Paris, 685 p.
- POSTAGE, J.R. 1963. Versatile medium for the enumeration of sulfate-reducing bacteria. Appl.Microbiol., Baltimore, 11:265-267.
- ROSS, R.T. 1963. Microbiology of paint films. Adv.appl.Microbiol., N.Y., London, 5: 217-233.
- SANBORN, J.R. 1933. Development and control of microorganisms in a pulp and paper mill system. J.Bact., Baltimore, 26: 373-378.
- \_\_\_\_\_. 1944. Slime-producing coliform and coliform-like bacteria. J.Bact., Baltimore, 48: 211-217.
- \_\_\_\_\_. 1965. Slime Control in the Pulp and Paper Industry. Lockwood Trade Journal Co., Inc. New York. 132 p.
- SILVEIRA, V.D. 1968. Lições de micologia. Livraria José Olympio - (3ª ed.), Rio de Janeiro, 301 p.
- SCHMITZ, H.; E.E.BATEMAN; R.H.COLLEY; S.R.CHURCH; C.HARTLEY; R.E. WATERMAN; A.L.KAMMERER; H. von SCHRENK; E.B. FULKS, E.E.HUBERT; C.S.REEVE; W.H.SNELL; C.A.RICHARDS; D.H.LINDER; J.D.BURNES & H.SCHMITZ. 1930. A suggested toximetric method for wood preservatives. Ind.Engng.Chem.analyt.Edn., Easton, Pa. 2(4): 361-363.
- SHAPIRO, S. 1958. The evaluation of fungicides for use in paints. Off.Dig.Fed.Paint Varn.Prod.Clubs., Philadelphia, 30: 414-430.
- SHIELDS, J.K. 1970. Brown-stain development in stored chips of spruce and balsam fir. Tappi, N.Y., 53(30): 455-457.
- STANIER, R.Y.; M.DOUDOROFF & E.A.ADELBERG. 1969. Mundo dos microbios. Edgard Blücher Ltda (Ed), USP, 741 p.

- STRANKS, D.W. 1970. Trichoderma viride enzymic degradation of wood structure. Bi-Mon Res. Notes, Can., 26(3): 23-24.
- TANSEY, M.R. 1970. Isolation of thermophilic fungi from selfleated, industrial, wood chip piles. Amer.J.Bot., 57(6-2): 747. (For. Abstr., 32(2): 3403).
- TASCHDJIAN, C.L. 1954. Simplified technique for growing fungi in slide culture. Mycologia, Lancaster, Pa., 46: 681-683.
- THOMSON, W.T. 1973. Agricultural Chemicals Book IV. Fungicides. Thompson Publications, 3<sup>a</sup> ed. 207 p.
- TORGESON, D.C. 1967. Fungicides - An advanced treatise. Academic Press N.Y. and London, 697 p.
- UNLIGIL, H.H. 1968. Depletion of pentachlorophenol by fungi. For. Prod. J.; 18(2): 45-50.
- WANG, C.J.K. 1965. Fungi of pulp and paper in New York. State Univ. College of Forestry at Syracuse University, 115 p.
- WATERS, V.F. 1957. Characteristics of water. IN Water technology in the pulp and paper industry. Tech.Ass.Pulp Pap.Ind., N.Y., Tappi Monogr. Ser. n<sup>o</sup> 18, 170 p.
- WESSEL, C.J. & W.M. BEJUKI. 1959. Industrial fungicides. Ind.Engng. Chem. analyt.Edn., Easton, Pa., 51(4): 52A-63A.
- WOLFSON, L.L. & R.J. MICHALSKI. 1964. The incidence and effects of the anaerobic bacteria, Clostridium, in paper mill systems. - Tappi, N.Y., 47(4): 197-199..

9 - APÊNDICE









Quadro II: Crescimento de populações microbianas do limo e do microrganismo T44 (*T. pullulans*) em "água ser vida" enriquecida ou não com glucose e, os diferentes períodos de incubação.

INÓCULOS	1º dia		4º dia		7º dia		14º dia	
	sem glucose	com glucose	sem glucose	com glucose	sem glucose	com glucose	sem glucose	com glucose
<i>Trichosporon</i>	15,0*	16,0	39,4	62,9	136,9	74,3	150,6	245,3
<i>pullulans</i>	15,4	14,7	60,2	53,0	146,3	66,2	98,3	392,0
T44	13,4	19,0	48,3	55,0	109,9	174,3	121,5	102,7
MÉDIA	14,6	16,6	49,3	57,0	131,0	104,9	123,4	235,7
Limo claro	14,6	13,7	63,8	63,0	90,5	64,4	40,5	33,4
	11,6	15,4	67,3	48,8	57,7	70,7	36,8	53,5
	13,8	11,3	23,0	62,5	68,4	93,7	59,6	83,4
MÉDIA	13,3	13,6	51,4	58,1	72,2	76,3	45,6	56,8
Limo intermediário	21,4	15,8	65,4	55,3	78,3	36,8	60,2	55,7
	10,5	19,2	19,1	53,9	29,8	42,3	42,6	59,9
	18,8	16,9	23,5	30,6	73,5	71,3	41,5	27,2
Média	16,9	17,3	36,0	46,6	60,5	50,1	48,1	47,6
Limo escuro	12,5	19,2	64,3	49,4	43,0	69,8	69,2	44,9
	13,3	14,1	15,0	55,1	55,6	64,4	67,4	19,9
	16,5	13,0	27,3	61,1	34,4	53,8	27,9	27,6
MÉDIA	14,1	15,4	35,8	52,2	44,3	62,7	54,8	30,8
MÉDIA GERAL	14,7	15,7	43,1	54,2	77,0	73,5	68,0	92,5

(\*) peso seco em mg

Quadro III: Efeito de concentrações de inóculo no crescimento de alguns microrganismos isolados do limo, em meio líquido de "água servida".

MICROORGANISMOS	Tipos cultu- rais	Repeti- ções	SUSPENSÃO DE ESPOROS			MÉDIA
			CONCENTRADA	DILUIDA	DILUIDA	
<u>Trichoderma viride</u>	T11	I	110,3*	135,7	119,0	114,3
		II	101,3	127,7	106,7	
		III	106,3	119,2	102,7	
		MÉDIA	105,9	127,5	109,5	
<u>Penicillium sp</u>	T92	I	116,6	101,5	76,6	105,3
		II	114,7	109,2	104,0	
		III	135,8	98,1	90,0	
		MÉDIA	122,7	102,9	90,2	
<u>Trichosporon cutaneum</u>	T46	I	54,3	43,9	28,3	43,0
		II	48,7	38,7	31,9	
		III	64,9	46,7	29,2	
		MÉDIA	56,0	43,1	29,8	
<u>Aspergillus niger</u>	T43	I	77,3	63,6	60,5	67,1
		II	81,3	64,3	62,2	
		III	77,7	55,4	61,2	
		MÉDIA	78,8	61,1	61,3	
M É D I A		90,8	83,7	72,7	82,4	

(\*) Fungo seco em ME.

Quadro IV: Efeito de alguns produtos químicos no crescimento de microrganismos isolados do limo e de uma população mista (limo claro).

Inóculos	Sem produtos	Santophem I	Merpacine	Derosal	Santacizer 9	Médias de inóculos
Trichosporon	64,0*	5,9	15,4	61,2	28,4	
cutaneum T46	58,7	2,3	19,6	31,2	25,1	
	48,1	5,3	7,0	28,7	26,0	
MÉDIA	56,9	5,2	14,0	40,4	26,6	28,6
<u>T. pullulans</u>	166,9	12,7	12,9	8,3	33,4	
T44	122,1	9,6	6,3	12,4	90,3	
	137,9	1,5	28,4	9,7	75,4	
MÉDIA	145,6	7,9	15,9	10,1	66,4	49,2
Limo	60,3	26,5	14,7	91,9	52,5	
claro	93,5	9,3	9,6	96,9	71,0	
	57,9	12,1	10,6	84,0	53,5	
MÉDIA	77,2	16,0	11,6	90,9	60,0	51,1
Média de tratamentos	93,2	9,7	13,8	47,1	51,0	43,0

\* Peso seco em mg