

## VALIDAÇÃO DE MÉTODO E DETERMINAÇÃO DA INCERTEZA NA CONTAGEM DE COLÔNIAS COMO ETAPA PARA A AVALIAÇÃO DE RISCO DE BIOPESTICIDAS

*Vera Lucia S. S. de Castro<sup>1</sup>, Paulo A. Lopes da Silva<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Embrapa Meio Ambiente, Laboratório de Ecotoxicologia, Jaguariúna, SP, Brasil, e-mail: castro@cnpmembrapa.br

<sup>2</sup> Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro - RJ – Brasil, e-mail: pauloafonsolopes@uol.com.br

**Resumo:** Os protocolos de avaliação de biopesticidas indicam como obter e testar dados a serem apresentados para o registro destes agentes microbiológicos. Assim, para se avaliar a segurança para humanos, analisam-se a presença e os efeitos desses agentes em tecidos, órgãos e fluidos corporais de roedores. Considerando-se o atual interesse na análise de agentes de controle microbiológico, este artigo apresenta uma metodologia para a determinação da estimativa da incerteza na contagem de colônias de *Pseudomonas putida*. Também propõe princípios de validação de métodos para detecção e análise de biopesticidas como auxílio na avaliação do desempenho dos agentes de controles microbiológico, visando o atendimento aos requisitos da norma ABNT ISO/IEC 17025:2005 para fins de acreditação de laboratórios. Um problema com o enfoque usual para testes microbiológicos é que a incerteza associada a alguns componentes do método nem sempre é quantificável; entretanto, os efeitos de outros componentes como as diluições, podem ser quantificados. Os dados necessários para estimar a incerteza da contagem e para validar a metodologia foram obtidos por meio de ensaios controlados, sendo identificadas as fontes individuais de incerteza e, estando estas sob controle, foram realizadas as medições necessárias. Em seguida, foram avaliadas as contribuições para a incerteza total na contagem de colônias.

**Palavras chave:** incerteza de medição, biopesticidas, análise microbiológica, validação de métodos.

### 1. INTRODUÇÃO

O mercado globalizado vem induzindo empresas a se adaptarem a requisitos internacionais de produção, especialmente aqueles de apelo ambiental. Em consequência, a comunidade analítica deve atender a requisitos de qualidade cada vez maiores, incluindo a estimativa da incerteza dos seus resultados, visando à acreditação segundo normas internacionais, tais como a ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005.

As normas de qualidade desses e de outros guias ou protocolos internacionais estabelecem mecanismos para promover a confiabilidade dos ensaios realizados evidenciando que os laboratórios operam de acordo com os requisitos estabelecidos pelas normas, o que atesta a competência técnica na realização desses ensaios.

O interesse no uso de opções mais viáveis economicamente e menos agressivas tem aumentado consideravelmente, refletindo o interesse crescente na conservação dos recursos biológicos e seu uso sustentável. Neste sentido, o uso de agentes microbianos de controle fitossanitário tem sido uma prática efetiva e apropriada para esses propósitos.

A grande maioria dos agentes microbianos usados como biopesticidas no ambiente brasileiro geralmente são específicos para a espécie-alvo, sendo presumivelmente seguros por esse motivo. Apesar disso, é requerida a avaliação de risco destes agentes pelos órgãos regulamentadores e, por esse motivo, os possíveis efeitos adversos decorrentes do uso de um biopesticida são estudados sobre organismos não-alvo do ambiente e incluem a flora e representantes de fauna de importância econômica, ecológica e ou social. Os agentes biológicos são então caracterizados quanto à saúde e à segurança ambiental de maneira mais apropriada por testes que considerem suas características.

Determinações microbiológicas, testes toxicológicos e ecotoxicológicos subsidiam a avaliação de risco de produtos microbianos utilizados como pesticidas. A avaliação de risco visa proporcionar previsões suficientemente precisas de efeitos adversos que o biopesticida possa ter sobre a saúde humana e o ambiente. Os protocolos são desenvolvidos em três vértices relativos aos efeitos patogênicos, efeitos tóxicos e potencial de infectividade.

A análise de risco é conduzida na forma de vários testes em fases sequenciais, envolvendo a obtenção de medidas em laboratório para verificação de capacidade de sobrevivência e reprodução em organismos não-alvo, inclusive. O atual esquema brasileiro de avaliação dos agentes microbianos foi adaptado da legislação internacional, seguindo o esquema de fases.

Essa avaliação de risco utiliza o conceito de máximo risco com uma dose-desafio na primeira fase de avaliação: a exposição do organismo teste, não-alvo do biopesticida, a uma alta concentração do biopesticida a fim de avaliar a pior situação possível de risco ambiental. Neste sistema, testes de curta duração são realizados, os quais oferecem a máxima oportunidade para os efeitos negativos se expressarem. Nos testes toxicológicos, a fim de avaliar a infectividade e eliminação do organismo, o agente deve ser quantificado em

tecidos, órgãos, e fluidos corporais de animais de ambos os sexos, sacrificados em diferentes intervalos após a exposição. O número de períodos de sacrifício exigidos dependerá da natureza do microrganismo de teste, e deve ser suficiente para estabelecer um padrão de liberação adequado. Os organismos não-alvos devem ser expostos a três tratamentos: agente microbiano ativo, inativo e controle (sem o agente microbiano).

Em análises microbiológicas, o processo de quantificação de colônias é complexo, pelas características particulares de, por exemplo, amostragem da porção de teste, preparação da suspensão inicial e das diluições decimais consecutivas, isolamento, incubação e contagem das colônias. Algumas fontes de incerteza podem ser avaliadas e outras não como a estabilidade da solução, que deve ter, contudo, a sua importância considerada para a variabilidade de resultados. Desse modo, pode-se tornar difícil estabelecer com precisão a contribuição de cada passo individual do processo analítico, porque o analito é um microrganismo vivo, cujo estado fisiológico é, naturalmente, muito variável.

A fim de estimar a incerteza geral, é necessário tratar separadamente cada fonte de incerteza para obter a contribuição total. Os componentes individuais de incerteza devem ser identificados e demonstrados estar sob controle, bem como terem a sua contribuição avaliada para a variabilidade de resultados. Na estimativa da incerteza total, deve ser considerada a incerteza de cada um dos componentes que contribuem para a mesma, sendo que a maioria das incertezas em microbiologia pode ser considerada independente [1]. A unidade da incerteza obtida será então expressa nas unidades usuais utilizadas em microbiologia, como número de colônias/g ou número de colônias/ml.

Tendo em vista a dificuldade de construir um modelo completo do processo de estimativa de incerteza de medição em análise microbiológica, bem como a escassez de relato detalhado de cálculo, este artigo contribui para avaliar os fatores principais responsáveis pela variabilidade nos resultados de análises de biopesticidas.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Descrição do ensaio

Foram realizados testes com a bactéria *Pseudomonas* que tem potencial para a degradação de grande variedade de xenobióticos, sendo também utilizada como biopesticida [2].

Para a realização da avaliação toxicopatológica e de infectividade desse agente microbiano em roedores de acordo com procedimentos referentes ao protocolo de exposição aos biopesticidas, realizou-se uma série de procedimentos, descritos a seguir:

a) os animais utilizados foram ratos Wistar, mantidos em condições padronizadas de luz, umidade e temperatura no Biotério do Laboratório de Ecotoxicologia e Biossegurança da Embrapa Meio Ambiente, sendo as matrizes fornecidas pelo Cemib / UNICAMP (Centro de Bioterismo, Universidade de Campinas). Os animais foram alojados em

gaiolas de polipropileno com cama de maravalha autoclavada. As gaiolas foram devidamente colocadas em salas com temperatura ambiente e umidade controladas ( $22 \pm 2^\circ \text{C}$  e 65 a 70%, respectivamente) por meio de aparelhos de ar condicionado e sistemas de ventilação e de exaustão com iluminação artificial de um ciclo claro-escuro de 12 em 12 horas, com início da fase clara às 7 horas. Água e ração foram fornecidas à vontade aos animais durante todo o período dos procedimentos experimentais. Finalmente, após o sacrifício, os animais foram congelados e incinerados.

b) no que se refere às características da colônia de *P. putida* e obtenção do isolado, a colônia é de cor amarelo esbranquiçada, gram-negativa, sensível à tetraciclina e canamicina, apresentando fluorescência. O isolado foi inicialmente repicado, ficando armazenado em estufa incubadora BOD (Biological Oxygen Demand) até aguardar seu crescimento. Na fase exponencial 18 h após o semeio em placa, o isolado foi centrifugado por 15 min em 5000 g, lavado em solução tampão fosfato (pH 7,0) e ressuspensionado no tampão [3].

c) nas doses e tratamentos, a linhagem testada foi administrada a ratos, em suspensões de  $10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Foi preparada uma suspensão concentrada e foram realizadas várias diluições com as células bacterianas colhidas do meio de cultura. A concentração da suspensão administrada foi ajustada por diluições com auxílio de espectrofotômetro ( $A_{600} = 0,3$  pela escala de McFarland) que corresponde a  $10^8$  ufc. $\text{mL}^{-1}$ ) [4]. Foram utilizados três tratamentos para cada via: bactéria ativa, bactéria inativada e, como controle, o veículo de administração da bactéria.

d) os animais foram observados diariamente em relação ao aparecimento de alterações clínicas; sendo verificados os seguintes itens: pele e pêlo; olhos e mucosas; aparelho respiratório e sistema circulatório; sistema nervoso periférico e central (tremor, diarreia, convulsão, letargia e salivação); padrão comportamental e tempo de morte.

e) os animais foram sacrificados e necropsiados com observação macroscópica dos órgãos em diferentes intervalos após a administração da bactéria. A necropsia é realizada dentro de uma câmara de fluxo laminar para evitar contaminação das amostras que serão utilizadas na quantificação das colônias. A fim de estudar a infectividade da bactéria no organismo animal, foram semeadas amostras de sangue, fígado, rim, mesentério e pulmão em placas de Petri contendo meio King B com propanil [5]; seguida de incubação e contagem das colônias.

f) o material sob análise, devidamente pesado e homogeneizado em solução salina (NaCl 0,9%), foi submetido a diluições seriadas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ), em triplicatas para cada diluição. A quantificação de colônias de *P. putida* foi realizada sob luz ultravioleta uma vez que a bactéria emite fluorescência. O número de colônias obtidas por placa foi anotado e o resultado expresso como sendo a média de repetições, transformado segundo cálculo de diluições, pesos e volumes e apresentado como unidades formadoras de colônias (ufc. $\text{mL}^{-1}$ ).

g) na identificação das colônias de *P. putida*, para confirmar a espécie das bactérias recuperadas dos órgãos necropsiados, realizou-se a extração de ácidos graxos da parede celular por meio da identificação dos isolados em cromatografia gasosa [6]. As bactérias a serem identificadas foram coletadas por meio de uma alça de metal e colocadas em tubos específicos. Na sequência, foram executadas quatro etapas para extração dos ácidos graxos celulares, sendo elas: saponificação, metilação, extração, onde a fase aquosa (inferior) é descartada e posterior lavagem. Após agitação e centrifugação, cerca de 75% da fase orgânica foram pipetados e repassados para um vial específico para o aparelho da Agilent 6580 e detector Flame Ionization Detector (FID), com injetor automático. A identificação comparativa é feita entre o cromatograma obtido e uma biblioteca interna ao aparelho, fornecida pelo aplicativo computacional Sherlock (Microbial Identification System), que calcula o índice de similaridade obtido para o isolado. A bactéria é considerada como perfeitamente identificada quando é encontrado um índice de similaridade maior que 0,600 e a diferença entre a primeira identificação e a segunda é de até 0,100 no índice de similaridade.

## **2.2. Considerações sobre a contribuição de cada fator para a estimativa da incerteza**

Para a confecção da solução inicial, uma alçada de *P. putida* cultivada em meio apropriado (King B) foi suspensa em solução salina e padronizada na Escala de McFarland. A concentração da solução inicial foi então ajustada por diluição de uma suspensão concentrada até o ajuste da turbidez desejada, ou seja, 0,3 em  $A_{600}$ , que corresponde a  $10^8$  ufc.ml<sup>-1</sup>. Em geral, as incertezas sobre absorvância podem ser transformadas diretamente em incerteza sobre concentração da suspensão contendo o agente microbiano. A incerteza na determinação da concentração é estabelecida pelas incertezas nas medidas do espectro de transmissão através da lei de Beer-Lambert que mostra que a absorvância apresenta uma relação linear com a concentração [7-8]. Contudo, em nosso estudo não há como medir linearidade ou repetitividade da leitura enquanto componentes da incerteza, porque foi lido um único ponto e não uma curva no espectrofotômetro.

Dos parâmetros relacionados à incubação, como o tempo, a experiência sugere que desvios de horas do tempo especificado não afetam os resultados significativamente [9]. Contudo, a importância deste parâmetro para a incerteza do método pode ser avaliada durante as repetições efetuadas para a validação do mesmo.

As pipetas utilizadas para as diluições podem introduzir uma fonte significativa de erro, que aumenta com a quantidade de diluições [9], bem como a pesagem dos órgãos avaliados. O procedimento utilizado para a determinação da massa dos tecidos envolveu duas etapas: a pesagem da placa de vidro vazia e posteriormente com o tecido. Uma vez que a massa dos tecidos foi obtida através da diferença de pesagens, ou seja, através de duas medições independentes realizadas na mesma balança em um período curto de tempo; a contribuição da resolução à incerteza foi desprezada [10].

A estimativa da incerteza da contagem de colônias viáveis é feita por meio da distribuição de Poisson. Uma vez que a quantidade real nunca é conhecida, a contagem observada é uma estimativa da média e ao mesmo tempo da variância [11]. A confirmação do agente microbiano também deverá entrar para o cálculo da incerteza final do procedimento, se feita no modo quantitativo.

Existem alguns pontos adicionais para considerar em testes de biopesticidas em mamíferos. É reconhecidamente difícil estimar a incerteza de ensaios que utilizam organismos, como com espécies animais e vegetais. O comportamento dos organismos teste depende em parte das condições ambientais do laboratório, e apesar de nem sempre quantificáveis, não são desprezíveis por afetarem os resultados.

Dessa maneira, deve-se avaliar se as condições de instalações como temperatura e luminosidade do biotério podem afetar os resultados e contribuir para a incerteza. Nos testes com biopesticidas em mamíferos, parâmetros como temperatura devem estar dentro de intervalos predeterminados. Porém, a faixa de valores críticos que ocasionam desconforto ao animal é grande. A variação na temperatura ambiental, mantida em  $22.0 \pm 2^\circ$  C, aparentemente não é suficiente para afetar a resposta do organismo ao agente microbiano. O mesmo raciocínio é válido para a resposta do organismo-teste a um ciclo 12-h claro/escuro mantido de forma constante, ou seja, não há variação na intensidade e quantidade de luz recebida. Embora a influência do peso corporal dos animais deva ser verificada, o protocolo recomenda que a variação de peso de animais adultos usados no teste não deva exceder  $\pm 20\%$  do peso médio para cada sexo e que os animais a serem utilizados devam ser saudáveis. Nessas condições o peso do animal não influirá no resultado avaliado, a saber, infectividade, toxicidade e patogenicidade; e a sua influência pode ser considerada desprezível. Além disso, estas respostas pelo organismo-teste não são de fácil quantificação já que dependem também da resposta imunológica e da sensibilidade ao estresse ocasionado pela variação ambiental; que são fatores biológicos.

## **3. RESULTADOS**

### **3.1. Proposta de modelo de validação do teste de biopesticida em roedores**

A validação de procedimentos analíticos é um aspecto vital para subsidiar a confecção de laudos emitidos pelos laboratórios, quer para testes de substâncias químicas quer para produtos biológicos, perante os órgãos oficiais.

O laboratório que realiza testes de biopesticidas pode usar a reprodutibilidade do método intra-laboratorial para estimar a sua própria incerteza. Neste caso, o método usado habitualmente pelo laboratório tem que ser submetido para estudo de validação. No contexto de biopesticidas, o resultado aceitável deve ser considerado cuidadosamente em uma avaliação caso a caso.

A maioria dos componentes ligados à natureza biológica não são quantificáveis. Portanto, a melhor maneira de determinar

a incerteza relacionada a esse teste é avaliar a reprodutibilidade interna. É recomendável ainda realizar a validação do processo de medição das condições ambientais para ensaios biológicos.

Em resumo, o estudo intra-laboratorial para validação pode ser feito por dois técnicos diferentes com a mesma dose ( $10^8$  unidades.mL<sup>-1</sup>) separadamente em pelo menos duas condições diferentes de laboratório como meio de cultura, equipamentos e condições de análise. Este procedimento deve ser feito para animais expostos ao agente microbiano, animais de grupo de controle e animais expostos ao agente microbiano inativado. Durante a avaliação, os tecidos, órgãos e fluidos corporais devem sofrer análise quantitativa das colônias e se cada um for interpretado como uma matriz diferente, a estimativa da incerteza pode ser feita em número limitado de matrizes tais como sangue, fígado, pulmão, baço e/ou rim. Outros tecidos ou órgãos como linfonodos representativos podem ser feitos na dependência do agente microbiano. Estes procedimentos devem ser feitos em três animais de um só sexo, sacrificados depois da exposição em um intervalo representativo de acordo com o agente microbiano estudado.

### 3.2. Cálculos para a estimativa da incerteza

Dois analistas diferentes realizaram o mesmo ensaio com a mesma dosagem, em separado e pelo menos, em duas condições de laboratório, com diferentes meios de cultura, reagentes e equipamentos. As suspensões iniciais foram preparadas de modo independente e tão diferentemente quanto possível, sendo feitas pelo menos duas repetições para cada conjunto de condições experimentais.

O primeiro passo foi compreender as possíveis fontes de variação e os pontos críticos do processo como um todo, após o que foram identificados os fatores que poderiam influenciar o ensaio, divididos em três grupos: seleção e exposição dos animais, enumeração dos agentes microbiológicos e confecção da suspensão de *Pseudomonas*.

Na seleção e exposição dos animais, nenhum fator foi considerado como influente na incerteza dos resultados, inclusive a temperatura do laboratório e a luminosidade, por serem padronizados em limites rígidos.

Na enumeração dos agentes microbiológicos, consideraram-se as balanças para pesagem das amostras de tecido, as pipetas para diluição e as contagens das colônias nas placas. Nessa ocasião, a confirmação de colônias não foi considerada, desde que os dados são qualitativos nessa fase. Observou-se que na enumeração desses agentes, as pesagens não influenciariam na estimativa da incerteza final, sendo, então, eliminadas. Quanto às pipetas, uma vez que mais de uma era utilizada, assumiu-se a incerteza máxima delas como a de todas, obtida a partir dos certificados de calibração. Na contagem das colônias, a incerteza foi obtida a partir do modelo de Poisson, por se tratar de variável discreta.

Na confecção da suspensão de *Pseudomonas* foram considerados termômetros, volume da suspensão, leitura no

espectrofotômetro e as pipetas para diluição. A incerteza do termômetro foi obtida do certificado de calibração, a da diluição pela expressão respectiva, que considera o fator de diluição e as incertezas das pipetas utilizadas, consideradas até a diluição final.

Ao final dessa análise, inclui-se a variabilidade devida ao analista. Esta incerteza do analista foi determinada pelo desvio-padrão das medições efetuadas por eles.

A determinação da incerteza expandida considerou todas essas parcelas.

Os resultados numéricos obtidos estão a seguir, onde  $u(x)$  representa a incerteza-padrão da variável  $x$ :

a)  $u(\text{temperatura}) = 0,17 \text{ } ^\circ\text{C}$

b)  $u(\text{diluição}) = \sqrt{\frac{a^2 u_b^2 + b^2 u_a^2}{a^4}} = 3,71$ . Como a diluição total consiste de 3 passos, então a  $u(\text{diluição final}) = 3 \times 3,71 = 11,13$ .

c)  $u(\text{analista})$  foi calculada igual a 3,39

Após, determinou-se a incerteza-padrão combinada da contagem final, usando incertezas relativas, porque as unidades de medidas são diferentes:

$$u(\text{contagem final}) = \text{contagem} \times \sqrt{\frac{u^2(\text{pipette})}{\text{volpip}^2} + \frac{u^2(\text{counting})}{\text{counting}^2} + \frac{u^2(\text{temp})}{\text{temp}^2} + \frac{u^2(\text{dil})}{\text{dil}^2} + \frac{u^2(\text{Analyst})}{\text{analyst}^2}}$$

$$= \text{contagem} \times \sqrt{\frac{0,41^2}{1000^2} + \frac{(3,02 \times 10^{-7})^2}{(3,31 \times 10^4)^2} + \frac{0,17^2}{22^2} + \frac{11,13^2}{1000^2} + \frac{3,39^2}{2,25^2}}$$

$$= 3,31 \times 10^4 \times 1,5067 = 4,9 \times 10^4$$

Somente as incertezas dos analistas são do tipo A e, então, os graus de liberdade efetivos calculados pela equação de Welch-Satterthwaite são:

$$GL_{\text{efetivos}} = \frac{\left(\frac{u_c(\text{counting})}{\text{counting}}\right)^4}{\sum_{i=1}^n \frac{u_i^4 / x_i^4}{GL_i}} = \frac{\left(\frac{4,99}{3,31}\right)^4}{\frac{1,5067^4}{13-1}} = \frac{5,0864}{0,4294} = 11,843 = 11.$$

Desse modo,  $k = 2,255$  para 95,45% de confiança.

Finalmente, a incerteza expandida  $U$  é dada por

$$U(\text{contagem}) = k \times u(\text{contagem}) = 2,255 \times 4,99 \times 10^4 = 11,25 \times 10^4 \text{ ufc/g.}$$

## 4. DISCUSSÃO

A validação do método proposto visa ajudar a comparação dos dados obtidos a partir dos testes de toxicidade, patogenicidade e infectividade de biopesticidas em mamíferos realizadas em diferentes laboratórios. Como não

se realizam rotineiramente ensaios de proficiência inter-laboratoriais para esse tipo de ensaio, o laboratório que realiza esses ensaios pode utilizar a reprodutibilidade do método para obter a sua própria incerteza. Neste caso, o método utilizado rotineiramente pelo laboratório tem que ser submetido a um estudo de validação intra-laboratorial, porque pode ser introduzida alguma tendência nos resultados obtidos pela coleta, transporte e armazenamento da amostra, incluindo a escolha do método e do rigor da aplicação de todos os procedimentos envolvidos.

Embora a estimativa da incerteza da quantificação microbiológica contribua para a identificação da fonte principal de erro no procedimento analítico, a incerteza adicional devido a variações quanto à estabilidade da preparação é um grande desafio para o microbiologista. Também é importante ressaltar que não é possível estimar a incerteza de um procedimento analítico sem o controle da qualidade das medidas realizadas pelo laboratório.

Ressalte-se que, ao contrário de Foster [12] que afirma que a principal fonte de erro é a precisão do método, temos observado que a principal causa de erro é, realmente, o analista, sendo o que mais contribui para a incerteza expandida.

Uma vez que esse cálculo não foi realizado antes para este tipo de ensaio, propomos uma nova metodologia. Contudo, observamos que a incerteza tem uma grande magnitude. Pode-se supor que uma maior incerteza seja esperada por envolver sistemas biológicos, além do crescimento do microrganismo, este por si mesmo uma fonte com grande variação inerente. Em consequência, a introdução de outra fonte de variação, o animal, contribuiu para a incerteza calculada. O crescimento do microrganismo em um organismo pode aumentar a incerteza da recuperação de colônias viáveis, porque a quantificação das colônias inoculadas - recuperadas será também dependente da resposta do animal. Pode-se atenuar esse problema aumentando o número de repetições, mas os custos em tempo e dinheiro oneram em demasia esta solução.

## 5. CONCLUSÃO

Usando o modelo descrito neste estudo, a execução do teste com biopesticidas em mamíferos pode ser mais facilmente avaliada, o que ajudará na comparação dos dados obtidos dessas análises realizadas em diferentes laboratórios.

## REFERÊNCIAS

- [1] R. Niemi S Niemelä Measurement uncertainty in microbiological cultivation methods. Accreditation and Quality Assurance 6:372-375, 2001
- [2] V Castro, I Melo Toxicopathological evaluation of rats exposed to *Pseudomonas putida*. Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology 2:1-5, 2007
- [3] W. Chobchuenchom, S Mongkolsuk, A. Bhumiratana, Biodegradation of 3-chlorobenzoate by *Pseudomonas putida* 10.2, World Journal of Microbiology & Biotechnology, 12: 607-614, 1996.
- [4] RA Lelliott, DE Stead Methods for the diagnosis of bacterial plant disease, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 216 p., 1987
- [5] F. Geels, B. Schippers, Reduction of yield depression in high frequency potato cropping soil after seed tuber treatment with antagonistic fluorescent, *Pseudomonas* spp. Phytopathology Z., 108: 207-214, 1983
- [6] C.W Bacon, D.M Hinton, A. Hinton Jr., Growth-inhibiting effects of concentrations of fusaric acid on the growth of *Bacillus mojavensis* and other biocontrol *Bacillus* species, Journal of Applied Microbiology, 100: 185-194, 2006
- [7] LD Rothman, SR Crouch, JD Ingle Theoretical and Experimental Investigation of Factors Affecting Precision in Molecular Absorption Spectrophotometry. Analytical Chemistry, 47 (8):1226-1233, 1975
- [8] FCC Oliveira, ATPC de Souza, JA Dias, SCL Dias, JC Rubim, The choice of the spectral region in the use of spectroscopic and chemometric methods. Quím. Nova, 27(2): 218-225, 2004.
- [9] JE Corry, B Jarvis, S Passmore, A Hedges A critical review of measurement uncertainty in the enumeration of food microorganisms. Food Microbiol 24(3):230-253, 2007
- [10] JH Buchmann, JES Sarkis, O conceito de incerteza aplicado aos processos de medição associados à preparação de uma solução de referência para calibração. Quím. Nova. 25 (1): 111-116, 2002.
- [11] S Niemelä Measurement uncertainty of microbiological viable counts. Accreditation and Quality Assurance 8:559-563, 2003
- [12] LI Forster Measurement uncertainty in microbiology. J. AOAC Int 86(5):1089-1094, 2003

Contato com os autores:

- 1) Vera Lúcia S. S. de Castro  
Embrapa Meio Ambiente, Laboratório de Ecotoxicologia e Biossegurança  
Rodovia SP 340, km 127,5  
13820-000 - Jaguariúna, SP, Brasil  
castro@cnpma.embrapa.br
- 2) Paulo Afonso Lopes da Silva  
Instituto Militar de Engenharia – SE/2  
Praça General Tibúrcio, 80 – Urca  
22290-270 – Rio de Janeiro, RJ, Brasil  
pauloafonsoledes@uol.com.br