

## COMUNICAÇÃO

# ERRO NA CONTAGEM DE FUNGOS PELO MÉTODO “POUR PLATE”<sup>1</sup>

Francisco Cleber Sousa Vieira<sup>2</sup>  
Newton La Scala Jr<sup>3</sup>  
Ely Nahas<sup>2</sup>

### RESUMO

O método de determinação de fungos de solo em placa foi avaliado pela contagem diária de colônias ou ao final do período de incubação. O número de UFC (unidades formadoras de colônias) por placa, contado ao término do período de incubação, foi menor que o encontrado somando-se as contagens diárias. As reduções foram de 0,6 a 27,9% e 0 a 13,5% em *Penicillium purpurogenum* e *P. viridicatum*, respectivamente. A redução na contagem de colônias de fungos de solo foi de 1,2 a 16,5%, correspondendo à diminuição de  $1 \times 10^4$  a  $4 \times 10^4$  UFC g<sup>-1</sup> solo. As reduções ocorreram devido à sobreposição de colônias durante crescimento do fungo.

Palavras-chaves: fungos do solo, contagem em placa, *Penicillium* spp., *Aspergillus niger*.

### ABSTRACT

## MISCOUNTING FUNGI USING THE POUR PLATE METHOD

The agar-plate method for fungi counts from soil samples was evaluated by colony counts carried out daily or at the end of the incubation period. The CFU number per plate counted at the end of the incubation period was lower than that found by summing up the daily counts. Reductions were from 0.6 to 27.9% and 0 to 13.5% for *Penicillium purpurogenous* and *P. viridicatum*, respectively. The observed reduction in colony counts of soil fungi from 1.2 to 16.5% corresponded to a reduction of  $1 \times 10^4$  to  $4.09\% \times 10^4$  CFU g<sup>-1</sup> soil. Such reductions were due to the overlapping of colonies during fungal growth,

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 03.05.2002

<sup>2</sup> Laboratório de Microbiologia do Solo, Dep. Produção Vegetal, FCAV/UNESP, 14884-900 Jaboticabal, SP. E-mail: enahas@fcav.unesp.br

<sup>3</sup> Dep. Ciências Exatas, FCAV/UNESP, 14884-900 Jaboticabal, SP.

resulting in the miscalculation of the total colony number when counts were performed only at the end of incubation.

Key words: soil fungi, plate count, *Penicillium* spp., *Aspergillus niger*.

Diferentes procedimentos diretos e indiretos têm sido utilizados para quantificar populações microbianas em solos. Entre os métodos indiretos, o método de contagem de fungos totais tem sido o mais utilizado e permite determinar o número de colônias crescidas em meio sólido em placas de Petri (5).

Diferentes condições de incubação têm sido utilizadas pelos pesquisadores. Harris et al. (1) cultivaram fungos no meio de cultura acrescido de rosa de bengala, a 22-25 °C, por 10 dias. Persmark et al. (6) utilizaram o meio de cultura WA (water-agar) e um período de incubação de uma a quatro semanas a 22 °C. Além das condições de incubação, a extração dos microrganismos do solo (7), o procedimento de contagem das colônias (9) e os métodos culturais empregados (3) podem influir nos resultados finais.

Nas avaliações das contagens de fungos têm sido verificado que, diferentemente das bactérias, os resultados não corresponderam aos efeitos esperados pela incubação de amostras de solos contendo diferentes fatores de crescimento (4, 8). Constatou-se, em experimentos envolvendo o isolamento e a contagem de fungos, menor número de colônias quando o período de incubação das placas de cultivo prolongou-se além de quatro dias.

Este trabalho teve como objetivo verificar a influência do procedimento de contagem sobre o número de unidades formadoras de colônias (UFC) de fungos.

*Material e métodos.* Amostras de solo foram coletadas da camada superficial (0-20 cm) de um Latossolo Vermelho-Escuro peneirado em malha de 2 mm e dividido em duas porções. Uma foi seca em estufa a 45 °C por cinco dias e esterilizada, e a outra guardada a 4 °C até o momento de utilizar.

O número de fungos foi determinado pelo método de diluição (9). Uma amostra de 10,0 g de solo úmido foi misturada com 95 mL de uma solução de pirofosfato de sódio 0,1% (p/v) e agitada por 30 minutos. Alíquotas das diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$  foram inoculadas pelo método "pour plate" em placas de Petri contendo meio de Czapeck (5) acrescido de penicilina e estreptomicina ( $0,1 \text{ g L}^{-1}$ , p/v) e  $70 \mu\text{g mL}^{-1}$  de rosa de bengala.

Para preparar os inóculos, *Penicillium purpurogenum*, *P. viridicatum* e *Aspergillus niger* foram cultivados por 15 dias a 30° C em tubos de ensaio contendo meio inclinado de Sabouraud para obtenção de esporos. Foram adicionados 10 mL de água esterilizada em cada tubo e

efetuada a raspagem dos esporos. A suspensão obtida foi filtrada em funil contendo gaze esterilizada e a contagem dos conídios foi feita em câmara de Neubauer.

Foram adicionados  $1,3 \times 10^8$  esporos por 100 g de solo esterilizado. Quando se inoculou uma mistura de duas espécies de fungos, a concentração de esporos de cada fungo foi dividida por dois. Uma amostra de 8 g de solo inoculado foi adicionada a 95 ml de solução de pirofosfato de sódio a 0,1 % (p/v). Após agitação por 30 minutos, foi feita uma diluição decimal até  $10^{-4}$ , inoculando-se o meio de Czapeck contido em placas de Petri. O volume do inóculo foi determinado preliminarmente de modo a se obter um número de colônias nos intervalos de 0 a 100, 100 a 200 e 200 a 300 por placa. As placas foram incubadas a 30 °C, e as contagens foram realizadas diariamente ou apenas no final do tempo de incubação, utilizando-se um contador de colônias com aumento de 6x. Quando se verificou o efeito da glicose, uma solução deste açúcar foi preparada e adicionada ao solo de modo a se obter uma concentração de  $0,2 \text{ mg g}^{-1}$  solo.

Todos os ensaios foram conduzidos com três repetições e quatro placas de Petri para cada diluição utilizada, utilizando-se delineamento inteiramente casualizado. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey (5 %).

*Resultados e discussão.* A escolha da técnica para estudar a população microbiana deve permitir o desenvolvimento de todas as unidades viáveis na amostra de solo, possibilitando a determinação quantitativa com maior exatidão dos microrganismos (2). Este trabalho demonstrou que para se obter esses resultados é importante considerar o método de contagem adotado.

O Quadro 1 apresenta os resultados das contagens diárias do número de colônias dos fungos inoculados em solo esterilizado. O crescimento do fungo *P. purpurogenum* pode ser constatado já no 2º dia de incubação. As contagens foram feitas até o 4º dia de incubação, anotando-se o número de novas colônias surgidas nas placas de cultivo a cada dia (Quadro 1). Assim, foram observadas 5,7 colônias de *P. viridicatum* no 2º dia de cultivo, 46,0 no 3º e mais 8,3 no 4º, somando 60,0 colônias. No 4º dia, foi feita a contagem do número total de colônias, segundo os critérios descritos em Material e Métodos, obtendo-se um total de 52,3 colônias. Portanto, verificou-se que houve redução das contagens comparando-se a soma dos números de colônias surgidas a cada dia e o número obtido apenas no último dia de incubação. A diminuição do número de colônias de *P. purpurogenum* variou de 0,6 a 27,9% e, de *P. viridicatum*, de zero a 13,5%. Quando *P. purpurogenum* e *P. viridicatum* foram inoculados juntos, foi obtida redução de até 28,5%. Esta diminuição foi diretamente

relacionada ao aumento do diâmetro da colônia em uma superfície limitada pela placa de Petri, ocorrendo assim sobreposição de colônias.

QUADRO 1 - Número de colônias de fungos inoculados em solo esterilizado							
Fungos	Número de colônias	Número de novas colônias/placa					Redução (%)
		2º dia	3º dia	4º dia	Soma	Final* 4º dia	
<i>Pv</i>	0-100	ND	29,0	5,0	34,0a	34,0b	0,0
	100-200	5,7	46,0	8,3	60,0a	52,3b	12,8
	200-300	12,0	48,0	8,6	68,6a	59,3b	13,5
<i>Pp x Pv</i>	0-100	3,0	55,0	7,0	65,0a	65,0 <sup>a</sup>	0,0
	100-200	3,0	67,3	7,3	77,6a	77,0 <sup>a</sup>	0,8
	200-300	5,0	111,5	8,0	124,5a	89,0b	28,5

\*Contagem ao final do período de incubação; ND = não detectado; números seguidos pelas mesmas letras em itálico não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). *Pp*, *P. purpurogenum*; *Pv*, *P. viridicatum*

Os resultados das contagens das colônias de fungos utilizando-se duas diluições da amostra de solo e volumes crescentes de inóculo encontram-se no Quadro 2. Na diluição  $10^{-2}$ , o crescimento dos fungos iniciou-se no 3º dia de incubação, observando-se o surgimento de 14,0 colônias por placa. Ao final, isto é, no 5º dia de incubação, foram encontradas 165,3 colônias, quando, pela somatória, deveriam aparecer 198,0 colônias. A redução calculada foi de 32,7 colônias ou 16,5%. Reduções menores, variando de 1,2 a 3,2%, foram observadas nas amostras mais diluídas. Esses dados mostram que quanto maior o número de colônias crescidas na placa, maior a sobreposição de colônias e a redução entre as duas formas de contagens, confirmando os resultados anteriores.

QUADRO 2 - Número de UFC de fungos do solo

Solo (diluição)	Inóculo (ml)	Número de novas colônias/placa					Redução (%)
		3º dia	4º dia	5º dia	Soma	Final* 5º dia	
10 <sup>-2</sup>	0,1	14,0	170,0	14,0	198,0 a	165,3 b	16,5
10 <sup>-3</sup>	0,1	ND	50,3	11,0	61,3 a	60,5 a	1,2
10 <sup>-3</sup>	0,2	ND	69,0	14,3	83,3 a	81,8 a	1,8
10 <sup>-3</sup>	0,3	ND	117,8	24,8	142,5 a	138,0 b	3,2

\* Abreviações e notas de rodapé como no Quadro 1.

Aparentemente, uma diminuição do número de colônias de 1,2% parece pouco expressiva, contudo correspondeu a diminuição de 10<sup>4</sup> UFC g<sup>-1</sup> solo, enquanto redução de 16,5 % correspondeu a diminuição de 4,09 x 10<sup>4</sup> UFC g<sup>-1</sup> solo.

Quando esporos de *Aspergillus niger* foram inoculados em solo contendo concentrações crescentes de glicose, foi observada redução da contagem que variou de 7,2 a 55,9%, à medida que aumentou o número de UFC por placa (Quadro 3).

QUADRO 3 - Número de UFC de *Aspergillus niger* inoculado em solo esterilizado, suplementado com glicose

Solo (diluição)	Glicose (mg g <sup>-1</sup> solo)	Número de novas colônias/placa					Redução (%)
		2º dia	3º dia	4º dia	Soma	Final* 4º dia	
10 <sup>-4</sup>	0	ND	134,5	1,6	136,1a	126,5a	7,1
10 <sup>-5</sup>	0	ND	66,8	5,9	72,6a	77,2a	-
10 <sup>-4</sup>	1	275,0	62,5	1,4	338,9a	188,8b	44,3
10 <sup>-5</sup>	1	180,0	52,5	1,1	233,6a	138,8b	40,6
10 <sup>-4</sup>	2	384,5	54,5	1,8	440,8a	194,6b	55,9
10 <sup>-5</sup>	2	368,0	35,6	1,5	405,1a	195,9b	51,6

\* Abreviações e notas de rodapé como no Quadro 1.

Em conclusão, este trabalho mostrou que quanto maior o número de colônias crescidas por placa, maior o erro na avaliação final das contagens de fungos. Assim, por estes resultados, concluiu-se que uma única contagem no final do período de incubação subestimou o número total de colônias crescidas na placa e esta diferença foi maior quando maior foi o número de colônias na placa. Dessa forma, mesmo que a concentração de

colônias por placa de Petri seja baixa, a contagem total deve ser o resultado da somatória das contagens diárias.

### AGRADECIMENTOS

Consignamos os agradecimentos à FAPESP pela concessão de bolsa ao FCSV.

### REFERÊNCIAS

1. HARRIS, P.A.; SCHOMBERG, H.H.; BANKS, P.A. & GIDDENS, J. Burning, tillage and herbicide effects on the soil microflora in a wheat-soybean double-crop system. *Soil Biol. Biochem.*, 27: 153-6, 1995.
2. KAUFMAN, D. D.; WILLIAMS, L.E. & SUMNER, C.B. Effect of plating medium and incubation temperature on growth of fungi in soil-dilution plates. *Can. J. Microbiol.*, 9: 741-51, 1963.
3. LORCH, H. J.; BENCKIESER, G. & OTTOW, J.C.G. Basic methods for counting microorganisms in soil and water. In: Alef, K. & Nannipieri, P. (eds.). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. London, Academic, 1995. p. 146 – 61.
4. NAHAS, E. & ASSIS, L.C. Effect of addition to soil of soluble phosphate from fluorapatite by a microbiological method. *Rev. Latino-Amer. Microbiol.*, 33: 225-9, 1991.
5. PARKINSON, D.; GRAY, T. R. G. & WILLIAMS, S. T. *Methods for studying the ecology of soil micro-organisms*. London, Blackwell, 1971. 115 p.
6. PERSMARK, L.; BANCK, A. & JANSSON, H.-B. Population dynamics of nematophagous fungi and nematodes in an arable soil: vertical and seasonal fluctuations. *Soil Biol. Biochem.*, 28: 1005-14, 1996.
7. RIIS, V.; LORBEER, H. & BABEL, W. Extraction of microorganisms from soil: evaluation of the efficiency by counting methods and activity measurements. *Soil Biol. Biochem.*, 30: 1573-81, 1998.
8. SCHNURER, J.; CLARHOLM, M. & ROSSWALL, T. Microbial biomass and activity in agricultural soil with different organic matter contents. *Soil Biol. Biochem.*, 17: 611-8, 1985.
9. WOLLUM II, A.G. Cultural methods for soil microorganisms. In: Page, A. L.; Miller, R.W. & Keeney, D.R. (eds.). *Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties*. Madison, Wisconsin, SSSA, 1982, p. 781-802. (Agronomy no. 9).