

Exercícios sobre Métodos de Contagem de Bactérias Viáveis em Placa:

Na Parte 1 dos exercícios sobre os métodos de contagem de bactérias viáveis em placa existiram questionamentos dos alunos sobre como detectar erros na análise realizada, uma vez que esse procedimento de análise possui inúmeras etapas que são críticas aos resultados.

As principais medidas para prevenção de erros se baseiam no controle dos materiais e reagentes utilizados, no treinamento do analista e na análise criteriosa dos resultados obtidos.

De modo geral, o controle de materiais como placas de Petri e ponteiros se baseia (principalmente) no controle da eficácia do processo de esterilização por autoclavação. Nesse são empregados: fita zebreada, indicadores biológicos, etc. O controle dos principais reagentes, meios de cultura e diluentes, é feito pelo Teste de Promoção de Crescimento e pelo Teste de Esterilidade.

O Teste de Promoção de Crescimento é realizado quando da abertura inicial do frasco do reagente e tem como objetivos verificar se o “lote” de meio de cultura apresenta capacidade de promoção do crescimento de amostras bacterianas de referência (quando os meios de cultura são seletivos e/ou indicadores esse teste também inclui a avaliação da seletividade e/ou o funcionamento do meio de cultura).

O Teste de Esterilidade dos meios de cultura é realizado por sua incubação prévia por 24 h a 35°C; se os meios que apresentarem contaminação são descartados. Este teste é sempre complementado pelos testes de controle da eficácia do processo de esterilização.

O treinamento do analista se baseia no conhecimento e prática na execução do procedimento de análise.

A análise criteriosa dos resultados obtidos se baseia em aspectos discutidos anteriormente na Parte 1, principalmente na coerência e concordantes com a diluição seriada realizada. Contudo, muitas vezes para evitar resultados inconclusivos das análises, o “plaqueamento” da diluição seriada é feita em duplicata (como será visto nos exercícios a seguir). Mesmo assim, existem situações onde alguns resultados devem ser descartados ou mesmo a análise fica invalidada em função impossibilidade do aproveitamento dos resultados obtidos.

A necessidade de analisar e decidir sobre a validade dos resultados das contagens de colônias nas placas é uma atividade comum no laboratório de Microbiologia. Por isso, existem “NORMAS” estabelecidas “*Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods – APHA*” e publicações similares para orientar esta decisão (digitalizados no final dos exercícios).

Não é objetivo destes exercícios que o aluno tenha conhecimento detalhado destas “NORMAS”, mas sim que ele saiba reconhecer uma situação onde é necessária sua aplicação, e nesse caso, ele poderá recorrer a elas. Na Parte 2 desses exercícios complementaremos as “NORMAS” citadas na Parte 1 e abordadas também análises com “plaqueamento em duplicata”.

Uma das “NORMAS” necessárias a realização dos exercícios da Parte 2, aplicável tanto no “plaqueamento” único como no em duplicata, é a Razão das Contagens (*Count Ratio*). Essa

“NORMA” determina que quando os resultados das contagens de colônias de diluições subsequentes não são aparentemente proporcionais seja feita a razão (divisão) dos resultados. Caso a Razão das Contagens seja menor que 2,0 prossiga normalmente fazendo a média dos resultados. Caso a Razão das Contagens seja superior a 2,0 descarte a maior contagem e considere somente o menor resultado.

Veja os exemplos abaixo com “plaqueamento” único:

Diluição	Contagem de Colônias	Contagem de Colônias Corrigida pela Diluição	Razão das Contagens	Resultado
10 ⁻¹	243	2430	3400 ÷ 2430 = 1,4	Média dos resultados obtidos: 2915
10 ⁻²	34	3400		

Diluição	Contagem de Colônias	Contagem de Colônias Corrigida pela Diluição	Razão das Contagens	Resultado
10 ⁻¹	140	1400	3200 ÷ 1400 = 2,3	Considere somente o menor resultado 1400
10 ⁻²	32	3200		

Veja os exemplos abaixo com “plaqueamento” em duplicata:

Diluição	Contagem de Colônias	Contagem de Colônias Corrigida pela Diluição		Razão das Contagens	Resultado
		Valores	Média		
10 ⁻¹	228	2280	2340	2700 ÷ 2430 = 1,1	Média dos resultados obtidos: 2520
	240	2400			
10 ⁻²	28	2800	2700		
	26	2600			

Diluição	Contagem de Colônias	Contagem de Colônias Corrigida pela Diluição		Razão das Contagens	Resultado
		Valores	Média		
10 ⁻¹	138	1380	1500	3600 ÷ 1500 = 2,4	Média dos resultados obtidos: 1500
	162	1620			
10 ⁻²	42	4200	3600		
	30	3000			

Exercícios - Determine o número de ufc / mL nas amostras abaixo.

Volume Plaqueado:	Diluição	Contagem de Colônias	Contagem de ufc/mL da amostra:
1 mL	10^{-2}	243	
	10^{-3}	53	

Volume Plaqueado:	Diluição	Contagem de Colônias	Contagem de ufc/mL da amostra:
0,1 mL	10^{-2}	243	
	10^{-3}	53	

Volume Plaqueado:	Diluição	Contagem de Colônias	Contagem de ufc/mL da amostra:
1 mL	10^{-2}	243	
		226	
	10^{-3}	25	
		26	

Volume Plaqueado:	Diluição	Contagem de Colônias	Contagem de ufc/mL da amostra:
1 mL	10^{-2}	143	
		126	
	10^{-3}	25	
		26	

Volume Plaqueado:	Diluição	Contagem de Colônias	Contagem de ufc/mL da amostra:
1 mL	10^{-2}	270	
		265	
	10^{-3}	28	
		26	

“Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods – APHA”

Count colonies on plates from individual samples according to the following set of guidelines.

Rule 1. One plate with 25 to 250 colonies

Select a plate with 25 to 250 colonies unless excluded by Rule 8. Count all colonies on the selected plate, including those of pinpoint size, record the dilution used, and report the total colonies as a basis for the Colony Count. (Table 1, Sample Nos. 1001, 1004, 1011, and 1012.)

Rule 2. Duplicate plates

Count plates with 25 to 250 colonies and average the counts to obtain the Colony Count (Table 1, Sample No. 1112). If more than one plate of a given dilution is prepared, but only one plate yields 25 to 250 colonies, count both plates unless excluded by Rule 8a or 8b. Include these counts

in the arithmetic average, and compute the count per gram by multiplying the average number of colonies by the dilution used. (Table 1, Sample Nos. 1113, 1114, and 1115.) When duplicate plates from consecutive decimal dilutions are counted, compute the count per milliliter for each dilution and proceed as in Rule 3. (Table 1, Sample Nos. 1011, 1014, 1015, 1016, 1017, 1018, and 1019.)

Rule 3. Consecutive dilutions (25 to 250 colonies)

If plates from two consecutive decimal dilutions yield 25 to 250 colonies each, compute the count per gram for each dilution by multiplying the number of colonies per plate by the dilution used, and report the arithmetic average as the Colony Forming Units (CFU) per gram, unless the higher computed count is more than twice the lower one, in which case report the lower computed count as the CFU per milliliter or per gram, as applicable. (Table 1, Sample Nos. 1002, 1003, 1111, and 1116.)

Rule 4. No plate with 25 to 250 colonies

If there is no plate with 25 to 250 colonies and one or more plates have more than 250 colonies, use plate(s) having a count nearest 250 colonies and count plate(s) as in Rules 3 and 7. Report as the Estimated Colony Count as CFU Est per gram. (Table 1, Sample Nos. 1006, 1009, and 1120.)

Rule 5. All plates have fewer than 25 colonies

If plates from all dilutions yield fewer than 30 colonies each, record the actual number of colonies on the lowest dilution (unless excluded by Rules 8a or 8c) and report the count as the Estimated Colony Count as CFU Est or per gram. (Table 1, Sample Nos. 1007 and 1121.)

Rule 6. Plates with no colonies

If plates from all dilutions of any sample have no colonies and inhibitory substances have not been detected, report the count as less than (<) one times the corresponding lowest dilution. For example, if no colonies appear on the 1:100 dilution, report the count as “less than 100 (< 100) Estimated Colony Count” as CFU Est or per gram as applicable. (Table 1, Sample Nos. 1005 and 1122.)

Rule 7. Crowded plates (more than 250 colonies)

If the number of colonies per plates exceeds 250, count the colonies in those portions of the plate that are representative of colony distribution, and calculate the Estimated Colony Count from these data. If there are fewer than 10 colonies per square centimeter, count the colonies in 12 squares, selecting 6 consecutive squares horizontally across the plate and 6 consecutive squares at right angles, being careful not to count a square more than once. Multiply the average per square centimeter by the area of the plate to determine the estimated number of colonies per plate, e.g., average count of 8 on 65 cm² plate, see Table 1, Sample 1014.

Table 1: Examples for Computing Colony Count per Milliliter or per Gram.

Sample No.	Colonies/Dilutions		Count Ratio ^a	Colony Count ^b (CFU/g or ml)	Rule
	1:100	1:1000			
Common application where 2 plates, one from each of 2 decimal dilutions, are poured					
1001	234	23		23,000	1
1002	243	34	1.4	29,000	3
1003	140	32	2.3	14,000	3
1004	Spr ^c	31	—	31,000	1
1005	0	0	—	<100 Est	6
1006	TNTC	7150	—	>6,500,000 Est	7
1007	18	2	—	1800 Est	5
1008	Spr ^c	Spr ^c	—	Spr ^c	8c
1009	325	20	—	33,000 Est	4
1010	27	215	—	LA	8c
1011	305	42		42,000	1
1012	243	LA		24,000	1
1013	TNTC	840		840,000 Est	7
1014	TNTC	520		520,000 Est	7

Table 1: Examples for Computing Colony Count per Milliliter or per Gram.

Sample No.	Colonies/Dilutions		Count Ratio ^a	Colony Count ^b (CFU/g or ml)	Rule
	1:100	1:1000			
Procedure where two or more plates per dilution are poured					
1111	228	28	1.1	25,000	3
	240	26	—		
1112	175	16	—	19,000	2
	208	17	—		
1113	272	18	—	25,000	2
	228	24	—		
1114	239	36	—	28,000	2
	328	19	—		
1115	275	24	—	30,000	2
	280	35	—		
1116	138	42	2.4	15,000	3
	162	30	—		
1117	228	28	—	24,000	2
	240	23	—		
1118	260	28	—	28,000	2
	240	33	—		
1119	224	28	1.4	24,000	2
	180	Spr ^c	—		
1120	287	23		28,000 Est	4
	263	19			
1121	18	2		1700	5
	16	0			
1122	0	0		<100 Est	6
	0	0			
1123	229	25		24,000	2
	245	LA			

^a Count ratio is the ratio of the greater to the lesser plate count, as applied to plates from consecutive dilutions having between 25 and 250 colonies.

^b All counts should be made in accordance with instructions in Section 4.51g rule 8 h as well as any other rules listed or given in the text.

^c Spreader and adjoining area of repressed growth covering more than one-half of plate.

