

Recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en placas de agar

Por Domenico Pavone

El recuento de microorganismos en una muestra es una técnica rutinaria en la industria. Se basa en la resuspensión, dilución y siembra de la muestra en una placa con medios de agar para luego contar el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) formadas. Pero el asunto no es tan fácil como parece. Existen ciertas cosas que debes saber para poder confiar en tus resultados. En este artículo te cuento algunas de ellas.

Conteo viable y UFC

El conteo viable es una de las técnicas más utilizadas en todas aquellas industrias donde el recuento de microorganismos ya sean patógenos o benéficos es crucial para conocer la calidad de un producto. Esta técnica se basa en tomar una muestra y resuspenderla en una solución madre y a partir de esta realizar diluciones seriadas (Figura 1). De estas diluciones se toman alícuotas y se siembran en placas con medios agarizados adecuados. Luego de 24 a 48 horas de incubación (o un poco más en el caso de hongos), se procede a realizar el conteo de las colonias en cada placa. Cada colonia formada proviene de alguna estructura que fue capaz de crecer (por lo tanto, estaba viva al momento de ser colocada en la placa) y formar una colonia (agregado celular que crece en un medio sólido y que puede verse a simple vista).

En este punto hay que saber que en el conteo de UFC existe una variabilidad intrínseca en los datos generados en esta técnica que no es posible evitar. La realidad es que, en el mejor de los casos, estamos haciendo una interpretación de una aproximación de la cantidad de microorganismos presentes en una muestra, es decir, es una **ESTIMACIÓN**.

La estructura a partir de la cual se forma una colonia no es necesariamente una célula individual, ya que esta puede ser formada a partir de una o varias células. Esto es especialmente cierto para hongos, donde una colonia puede formarse de una o varias esporas juntas o incluso a partir de un fragmento de micelio. En este caso, la hidrofobicidad de las esporas que tiende a agruparlas, e incluso la fragmentación del micelio durante el procesamiento en las diluciones seriadas

pueden dar origen a una colonia. Por otro lado, en el agar solo crecerán aquellas células que puedan hacerlo en esas

condiciones de tipo de medio, temperatura, oxígeno, tiempo, separación de otras colonias, entre otros factores.

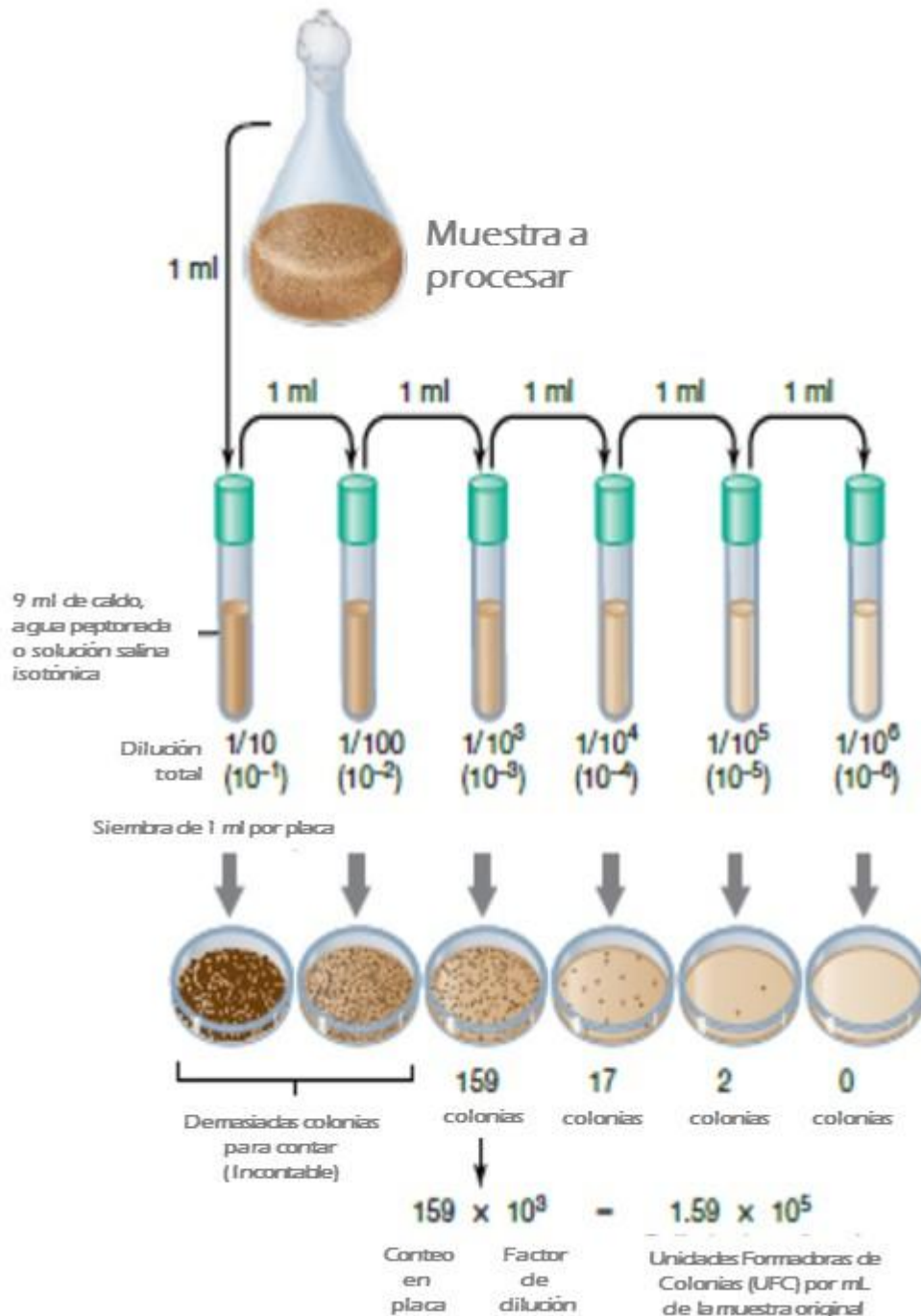


Imagen original de Madigan et al. 2019. Biology of Microorganisms

Figura 1. Método de conteo viable de microorganismos.



Revisa la oferta de entrenamientos en Microbiología agrícola, de alimentos e industrial en nuestra página web

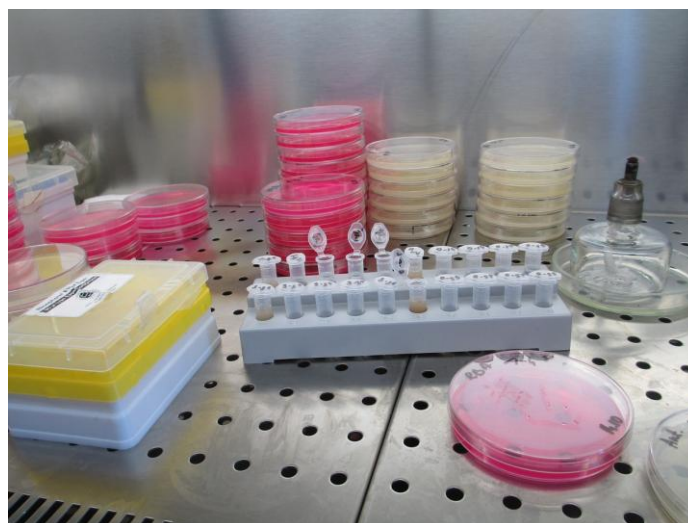
<https://eduvitaweb.com>

El intervalo contable en el recuento de microorganismos.

Cuando contamos colonias en placas de agar, podríamos sentirnos tentados a contar aquellas placas con diluciones que dieron lugar a pocas colonias. Pero ten cuidado, ¡esto es un error! En Microbiología existe lo que se conoce como el intervalo contable, el cual es el número mínimo y máximo de colonias que pueden estar presentes en una placa para el conteo. Este valor dependerá del tipo de microorganismo y se aceptan entre 25 – 250 colonias ó 30 – 300 colonias. En mi caso particular que trabajo con el hongo *Trichoderma* que coloniza muy rápido la placa, es imposible contar 250 colonias. Por ello, en el caso de hongos se recomienda un intervalo contable entre 10 a 100 colonias. Conviene revisar las normas

específicas que aplican para la muestra a estudiar, cuando estas existan.

El límite superior depende en gran medida del tamaño de la colonia y su comportamiento, especialmente de su capacidad para fusionarse con las demás. Si las colonias comienzan a competir entre ellas por su alto número, esto le adicionará error experimental al resultado. Con respecto al límite inferior debemos jugar con los parámetros “límite de detección” (1 UFC) y “límite de cuantificación” (25 UFC). En algunos trabajos (Sutton, 2011) se ha reportado poca exactitud en conteos por debajo de 25 colonias por placa, ya que al disminuir el número de colonias el error aumenta exponencialmente.



La técnica de conteo viable requiere preparación y experticia.

¿Cuántas diluciones se deben sembrar?

Ya hablamos de la variabilidad en los conteos de las UFC, por ello las réplicas son importantes. En los protocolos para determinar UFC en una muestra, siempre se debe incluir la siembra de varias diluciones consecutivas (yo recomiendo tres). Nótese que, si se siembra una sola dilución (1/10) y conseguimos 28 colonias, reportaremos este valor como resultado; pero ¿y si sembramos dos diluciones consecutivas (1/10 y 1/100) y obtenemos por ejemplo 31 y 28 colonias, respectivamente? ¿Qué valor se reporta? De aquí la importancia de sembrar varias diluciones, ya que esto nos permite verificar si existe el efecto de la dilución en lo que estamos observando. En estos casos donde dos diluciones consecutivas poseen conteos similares, mi recomendación es realizar de nuevo la determinación. También pueden ocurrir situaciones como por ejemplo que dos diluciones consecutivas tengan colonias dentro del intervalo contable (por ejemplo 1/10 = 249 colonias y 1/100 = 26 colonias). En estos casos se reporta el promedio de las dos diluciones, ya que ambas dan prácticamente el mismo resultado.

¿Y qué pasa cuando hay un número bajo de microorganismos?

Otro caso importante es la presencia de un número bajo de microorganismos en la muestra. Para esto, encontré un trabajo muy interesante de Jongenburger et al (2010), del cual traduje algunas ideas importantes que en mi opinión no tienen desperdicio:

Se han asumido muchas cosas del proceso de establecer cuales resultados de la enumeración cumplirían con la calidad y seguridad de los alimentos. Una suposición clave es que los

microorganismos se distribuyen homogéneamente en los alimentos, lo cual es muy improbable especialmente en alimentos sólidos. Sin embargo, el impacto de la heterogeneidad entre las muestras sobre la exactitud del método del conteo en placas no ha sido cuantificado sistemáticamente. Para evaluar la exactitud del método del conteo en placa, la toma de muestras es importante, ya que, si las muestras no representan el estatus microbiano del lote, aunque el conteo sea exacto, estos resultados no darán información confiable.

Los resultados de Jongenburger et al, confirman que conteos bajos en placa, así como la heterogeneidad microbiana afectan la exactitud del método, impactando en mayor medida que incluso los errores técnicos. Así, para conteos bajos, aumentar el límite inferior de conteo, incrementa en gran medida la exactitud de los resultados.

Los conteos debajo de 25 colonias están dominados por el error de la distribución de Poisson, si se incrementa el límite inferior de conteo (para conteos bajos) de 10 a 25, se reduciría el error de la distribución de Poisson. Otro hallazgo del trabajo es que para muestras en polvo es más exacto tomar 10 muestras sembradas individualmente que 5 muestras sembradas por duplicado.

10 Recomendaciones para realizar conteos confiables de colonias en placas de agar.

- 1.- Entrénate bien en pipeteo y manejo aséptico de muestras.
- 2.- Revisa que los volúmenes usados en pipetas, tubos, frascos, etc., sean los correctos.

- 3.- Si vas a procesar una muestra sólida, asegúrate de hacerlo en un volumen adecuado para lograr una suspensión total y homogénea de la misma.
- 4.- Cada vez que tomes una alícuota de la muestra original o de los tubos de la dilución asegúrate de que estén bien homogéneos (agita bien justo antes de tomar la muestra).
- 5.- Cuenta solo en placas con diluciones que dieron lugar números de colonias dentro del intervalo contable (25 a 250 colonias para bacterias y 10 a 100 colonias para hongos).
- 6.- Siembra varias diluciones consecutivas para verificar el efecto de la dilución.
- 7.- No olvides ningún dato a la hora de hacer los cálculos: volumen de siembra, dilución,

volumen de la suspensión madre, masa de la muestra (solo sólidos).

8.- Escribe de forma detallada el protocolo a utilizar con base en normas legales de tu País y haz que esté disponible para todos los miembros de tu equipo.

9.- Unifica criterios del protocolo y siembra con otras personas de tu equipo que realizan o pudieran en un futuro realizar estas pruebas. Organiza competencias entre los responsables de estas pruebas para que las realicen de forma independiente a una misma muestra y puedan verificar que a todos les da el mismo resultado.

10.- Capacítate continuamente. ¡Nunca dejes de aprender!

Ya ves que el conteo viable tiene sus cuidados. La próxima vez que hagas un conteo en placa no te limites a ver cuántas colonias crecieron, revisa tu protocolo en contexto, entrénate y práctica para disminuir el error técnico (diluciones, pipeteo, etc.), toma un número suficiente y representativo de muestras y revisa que estés dentro del intervalo contable. Recuerda siempre que mientras más te alejes por debajo del límite inferior, mayor será el error.

¿Quieres leer las publicaciones originales usadas para este artículo?

[Jongenburger I. Reij M. Boer E. Gorris L. Zwietering M. 2010. Factors influencing the accuracy of the plating method used to enumerate low numbers of viable micro-organisms in food. *International Journal of Food Microbiology* 143 \(2010\) 32–40.](#)

[Sutton S. 2011. Accuracy of Plate Counts. *Journal of Validation Technology* 17\(3\) 42 – 46.](#)



Domenico Pavone es biólogo y especialista en protección vegetal. 18 años como profesor universitario y autor de artículos científicos en biocontrol de plagas y enfermedades agrícolas.
Correo electrónico: dfpavoneuc@gmail.com.

Eduvita mantiene una política de abierta libertad para los autores de los artículos publicados en el Blog de esta página web.

Eduvita no se hace responsable por las afirmaciones u opiniones emitidas por los mismos. Ante cualquier duda, escriba directamente al autor.