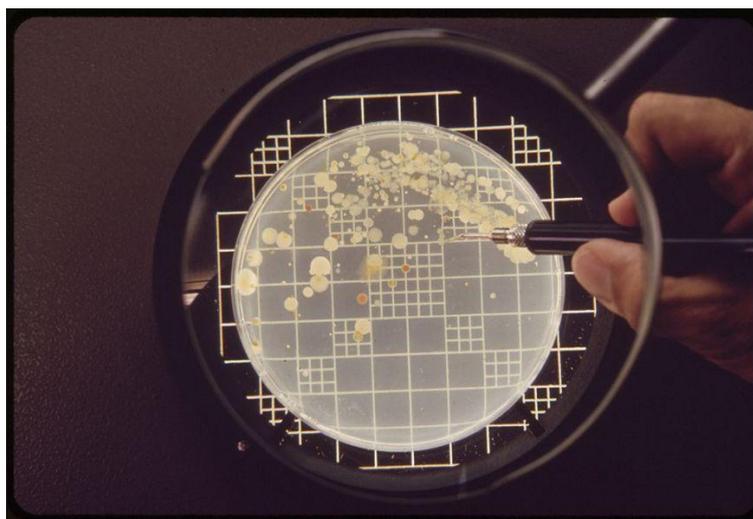


# Contando colonias en placas de agar.

Por Domenico Pavone

El conteo 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 de agar, para luego contar el número de colonias 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.



El conteo viable de Unidades formadoras de colonias (UFC)

## Conteo viable y UFC

Antes que nada tienes que entender 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**.

Otra cosa importante que debemos entender es el origen de una colonia, la cual se define como una agregación celular visible a simple vista en una superficie sólida. En relación a su origen hay

que saber que presuponer que una sola célula siempre da lugar a una colonia, es un error, 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. Aquí, la hidrofobicidad de las esporas que tiende a agruparlas, e incluso la fragmentación del micelio durante el procesamiento en las diluciones seriadas, pueden jugar un mala pasada. 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.

### ¿Y qué es el intervalo contable?

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 o 30 – 300 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 añadirá sesgo al resultado.

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.

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 con conteos por debajo de 25 colonias por placa, ya que al disminuir el número de colonias el error aumenta exponencialmente.

### ¿Por qué sembrar varias diluciones?

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 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 28 y 32 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 extremos mi recomendación es realizar de nuevo la determinación. Sin embargo, pueden ocurrir situaciones como por ejemplo que dos

diluciones consecutivas tengan colonias contables dentro del intervalo de conteo (lo ideal es que esto no ocurra). En estos casos dependiendo de la norma usada, existen recomendaciones.

### ¿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. El aporte del estudio de Jongenburger es precisamente en este sentido. 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.

### En resumen

En conclusión, 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. 15 años como profesor universitario y autor de artículos científicos en biocontrol de plagas y enfermedades agrícolas.