

MICROSCOPIA PARA LABORATORIOS CERVECEROS

MICROSCOPIO ÓPTICO

RECOMENDACIONES PARA EL USO DEL
MICROSCOPIO ÓPTICO

USO DEL MICROSCOPIO

OBSERVACIÓN DE MICROORGANISMOS



CAPÍTULO 7: MICROSCOPIA PARA LABORATORIOS CERVECEROS

Caramuti, Valeria Eugenia; Ruiz Espindola, Milton; Gallace, María Eugenia y Dalmasso, Lucas Pablo

El microscopio es fundamental en cualquier laboratorio de microbiología para observar microorganismos, tanto de forma directa como a través de coloraciones. Esta herramienta es sumamente útil en un laboratorio cervecero ya que permite realizar recuento de levaduras y determinar su viabilidad de manera rápida y sencilla. En la primera parte de este capítulo se abordan las características generales de un microscopio óptico y su funcionamiento. En la segunda parte, se explican técnicas microbiológicas básicas para realizar tinciones y recuento de células a través del uso de una Cámara de Neubauer.

7.1 MICROSCOPIO ÓPTICO

Un microscopio óptico de luz transmitida consiste básicamente en un tubo con lentes de aumento en ambos extremos. Permite visualizar estructuras pequeñas, cuyas dimensiones son inferiores al poder de resolución del ojo humano. La luz es emitida desde abajo, por lo que los objetos a observar deben ser lo suficientemente transparentes para formar las imágenes. Un microscopio óptico cuenta con elementos mecánicos, elementos ópticos y un sistema de iluminación (Figura 7.1 y 7.2) que permiten la amplificación (aumento) y el poder de resolución.

7.1.1 Elementos mecánicos

En la Figura 7.1 se puede observar un microscopio y las distintas partes del mismo. La parte mecánica consta del pie, la columna o brazo, la platina, el tubo y los tornillos macrométrico y micrométrico. El pie (Figura 7.1, A1) se encuentra en la base, suele tener forma de herradura o “T” y en él descansa el resto del microscopio. La columna o brazo (Figura 7.1, A2), ubicada sobre el pie, sirve de soporte a los accesorios y debe tomarse de la misma cuando se desea trasladar el microscopio, aunque de ser posible no deben transportarse para evitar deterioro y rupturas.

La platina (A3), ubicada en la parte media, de forma cuadrada o rectangular, soporta el preparado y presenta un orificio en el centro que permite el paso de la luz; una pinza de sujeción (A4) para el preparado y sobrepuesta a ella un sistema mecánico que permite mover el mismo a voluntad en dos direcciones (llamadas Norte-Sur y Este-Oeste), mediante el movimiento de tornillos ortogonales (A5) ubicados sobre la platina o pendientes de ella. El tubo (A6) sostiene al sistema óptico, en la parte superior se ubican las lentes oculares (B11) que pueden ser una, monoculares, o dos en los microscopios binoculares. En su extremo inferior se ubica el revólver (A7), una placa giratoria que sostiene las lentes objetivos (B10), de distintos aumentos, que pueden cambiarse al girar el revólver. Los tornillos macrométrico (A8) y micrométrico (A9) se utilizan para enfocar el material a observar, el primero efectúa un ajuste rápido y grosero, y el segundo un ajuste lento y preciso.

7.1.2 Elementos ópticos

Los elementos ópticos son los objetivos, las lentes oculares y el condensador. Cada objetivo consiste en un conjunto de lentes que permiten un determinado aumento. En los microscopios modernos es común que los objetivos sean parafocales, es decir, cuando se encuentra enfocado uno de ellos, al girar el revólver y cambiar por otro objetivo, éste resulta prácticamente enfocado, siendo suficiente sólo una ligera corrección con el micrométrico para lograr el enfoque perfecto. Existen dos tipos de objetivos, los secos y los de inmersión y se diferencian entre sí en función del medio situado entre la muestra y la lente del objetivo. En los objetivos secos, no hay ningún medio entre la muestra y el objetivo solo aire. Los objetivos de inmersión, en cambio, están diseñados para observar la muestra a través de aceite de inmersión.

Los oculares son un sistema de lentes que amplía la imagen producida en el objetivo. Los oculares más habituales son los de 6X y 10X, cuya denominación está grabada en el lateral de cada ocular, y determinan el aumento primario. El aumento total se obtiene multiplicando el aumento del ocular por el aumento del objetivo, e indica cuántas veces está ampliada la imagen que se obtiene del material examinado. Por ejemplo si un microscopio posee un ocular de 10X y se está observando con el objetivo de 40 X, el aumento total es 400X, es decir amplifica la imagen 400 veces.

El condensador (Figura 7.2, B12) está constituido por una lente que concentra los rayos y proporciona un cono de luz adecuado en tamaño y naturaleza, para obtener resultados óptimos en la observación. El condensador presenta un tornillo (Figura 7.2, B13) que permite el desplazamiento vertical (subir y bajar) según las necesidades del observador. Además, posee un diafragma semejante al de una cámara fotográfica que deja penetrar sólo los rayos útiles y elimina los laterales que generalmente molestan. La apertura y cierre del diafragma permite modificar el brillo y contraste de la muestra. El diafragma también debe ajustarse al objetivo seleccionado, los de menor aumento necesitan menor cantidad de luz, y se recomienda cerrar el diafragma, en cambio, los de mayor aumento necesitan más luz, por lo tanto el diafragma se debe abrir.

7.1.3 Sistema de iluminación

El sistema de iluminación del microscopio consta de una fuente de luz y dos perrillas, una de encendido y otra que regula la intensidad de la luz (Figura 7.2, C14, C15 y C16). Existen básicamente dos tipos de fuentes de luz, la bombilla incandescente y los emisores LED. Los emisores LED brindan mejor calidad de luz y su durabilidad es mayor.

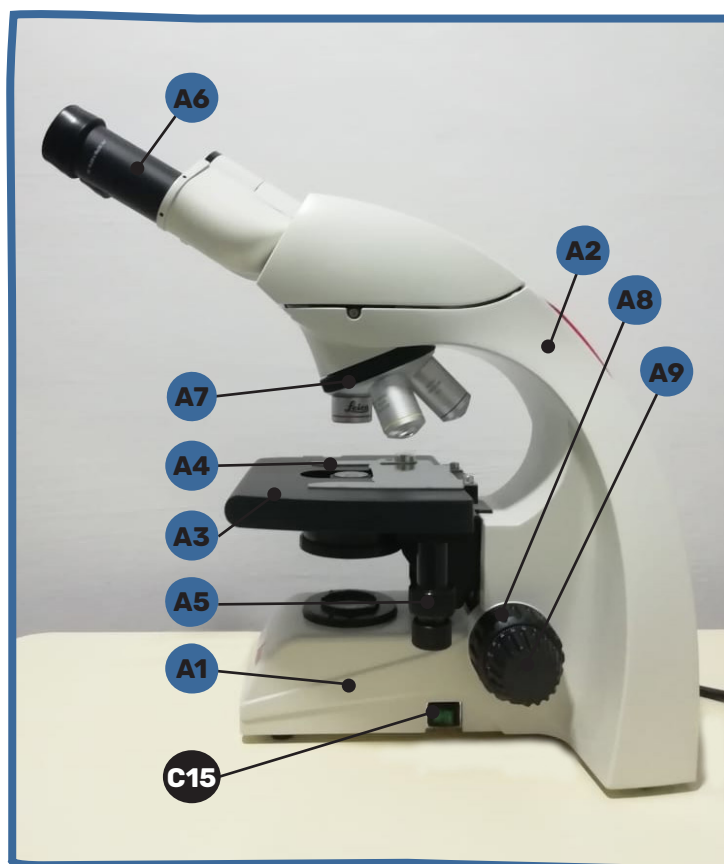


Figura 7.1: microscopio vista lado derecho. Elementos mecánicos (A): pie (A1), brazo (A2), platina (A3), pinza de sujeción (A4), tornillos ortogonales (A5), tubo (A6), revólver (A7), tornillo macrométrico (A8), tornillo micrométrico (A9). Sistema de iluminación (C): perilla de encendido (C15).

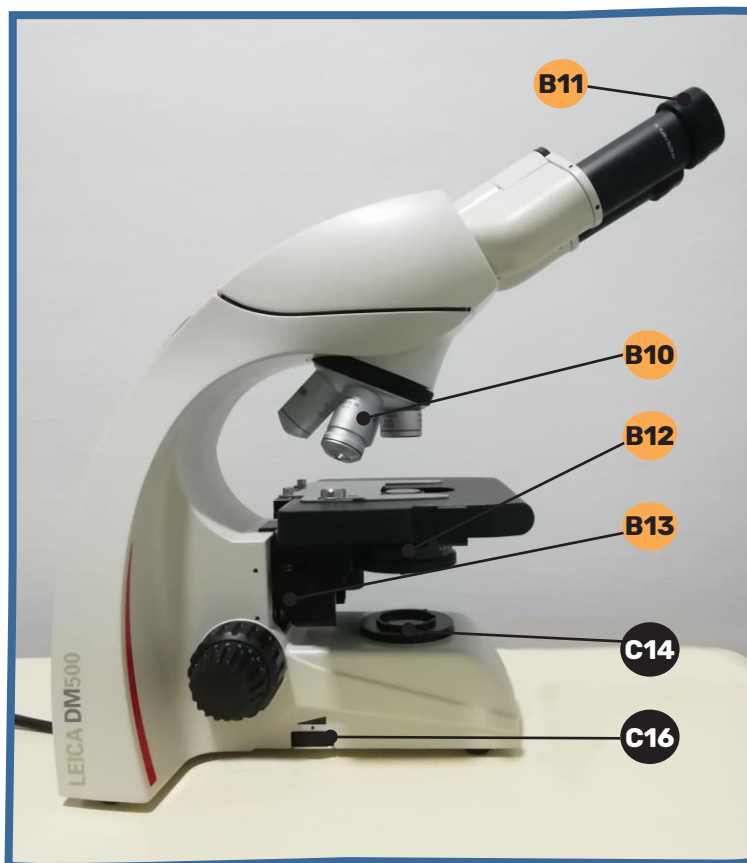


Figura 7.2: microscopio vista lado izquierdo. Elementos ópticos (B): objetivos (B10), lentes oculares (B11), condensador (B12), tornillo del condensador (B13). Sistema de iluminación (C): fuente de luz (C14), perilla regulación de intensidad (C16).

7.2 RECOMENDACIONES PARA EL USO DEL MICROSCOPIO ÓPTICO

1. Las observaciones con objetivos secos comienzan con el de menor aumento. Esto le dará una visión integral del preparado y le permitirá seleccionar las mejores áreas o las de especial interés, que luego observará con mayores aumentos.
2. La iluminación debe ser homogénea y de buena intensidad, pero no excesiva y deberá modificarla de acuerdo con el objetivo que utilizará.
3. Nunca acerque el objetivo al preparado si no está mirando por el costado del microscopio, así evitará la destrucción de muestras y lentes.
4. Siempre que haga una observación, ajuste el enfoque con el tornillo micrométrico, aun cuando ya haya sido enfocado por otra persona previamente (es usual que existan diferencias de enfoque entre un observador y otro).
5. El microscopio óptico otorga imágenes invertidas del objeto, por lo tanto, el movimiento que realice de la platina será inverso al corrimiento de la imagen.
6. Los portaobjetos y cubreobjetos deben estar siempre limpios y secos.

7.3 USO DEL MICROSCOPIO

A continuación se detallan los lineamientos generales para la observación en microscopio con objetivos secos:

1. Separar completamente la platina del objetivo mediante el tornillo macrométrico.

2. Colocar el preparado microscópico (portaobjeto) en la platina y ajustar con la pinza de sujeción.
3. Colocar el objetivo de menor aumento (de rastreo), generalmente es 4X.
4. Encender el microscopio.
5. Utilizar los tornillos ortogonales para centrar la zona a observar del portaobjeto en línea con el objetivo.
6. Observar el preparado por el costado del microscopio y levantar la platina cuidadosamente con el tornillo macrométrico hasta hacer tope, o bien hasta que la lente del objetivo se encuentre más o menos a 1 mm de la superficie del portaobjeto.
7. Observar por los oculares y enfocar hasta que la imagen sea nítida con ayuda de los tornillos macro y micrométrico. Buscar el mejor lugar de observación (bordes) y ajustar la intensidad de la iluminación, la apertura del diafragma y la altura del condensador.
8. Cambiar al objetivo mayor siguiente y volver a enfocar (solo utilizar el micrométrico). Repetir la operación hasta llegara enfocar con el objetivo de 40X o 60X (según modelo de microscopio).

7.3.1 Técnica de inmersión

Esta técnica se utiliza cuando se desea observar partículas muy pequeñas o células de bacterias. El objetivo de inmersión, como su nombre lo indica, necesita emplear aceite de inmersión entre el objetivo y la muestra, y tiene un aumento de 95 o 100X (en el lateral indica *oil*). La ventaja de utilizar los objetivos de inmersión es que, la luz que llega al objetivo no necesita atravesar el aire, lo que se traduce en un aumento en la calidad de imagen ya que reduce la refracción de la luz incidente. En consecuencia, los objetivos de inmersión son utilizados en aplicaciones donde se requiere un gran aumento y alta resolución.

Procedimiento:

1. Bajar la platina del microscopio con el tornillo macrométrico y colocar el portaobjeto.
2. Colocar sólo una gota de aceite de inmersión sobre el preparado (una pequeña gota es suficiente).
3. Poner el objetivo de inmersión en posición de observación, **recordar que es el único objetivo que se puede utilizar en esta técnica.**
4. Observar por fuera de los oculares del microscopio, subir la platina con el tornillo macrométrico hasta que el objetivo toque la gota de aceite. A partir de ese momento el objetivo estará prácticamente dentro de su distancia focal. Enfocar el preparado con movimientos suaves del tornillo micrométrico.
5. Terminada la observación, bajar la platina y limpiar el objetivo con papel de seda o de cigarrillo. **No debe utilizarse alcohol para limpiar las lentes, ya que deteriora el pegamento que las sostienen.**

Importante: evitar todo contacto entre el objetivo y el cubreobjetos, ya que distancia de trabajo que existe cuando se utilizan objetivos de 40X a 100X es muy reducida (aproximadamente 0,12 mm) puede suceder que la lente frontal tome contacto con el cubreobjetos con lo cual dicha lente puede rayarse o desplazarse hacia atrás. Actualmente los objetivos cuentan con un sistema protector retráctil situado en el interior del tubo del objetivo, sin embargo se debe tener precaución pues los microscopios antiguos o de menor tecnología no presentan este mecanismo de seguridad.

7.4 OBSERVACIÓN DE MICROORGANISMOS

Existen técnicas para observación de microorganismos vivos (preparados frescos) y otras llamadas frotis donde se fijan microorganismos al portaobjetos y se les realiza una tinción posterior. Las tinciones ofrecen información adicional a la simple observación de la morfología, ya que ponen de manifiesto, por ejemplo, características de la pared celular o la existencia de estructuras especiales, como esporas bacterianas.

7.4.1 Preparados frescos

La confección de preparados para observación en fresco es la técnica más simple de examinar microorganismos vivos, y consiste en suspenderlos en un medio líquido como agua.

Materiales:

- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Ansa en anillo
- Mechero de Bunsen
- Microscopio óptico

Procedimiento:

1. Esterilizar el ansa en anillo a calor directo de la llama del mechero.
2. Colocar una pequeña porción de muestra en el portaobjeto.
3. En muestras con alta concentración de microorganismos (crema de levaduras o bacterias de una colonia de una caja de Petri) se puede añadir una gota de agua con el ansa, previamente esterilizada, para diluir la suspensión. En muestras de cerveza no es necesario agregar agua.
4. Apoyar el lateral de un cubreobjeto en la superficie del portaobjeto de manera tal que al soltar el cubre, tape la muestra y así evitar burbujas en el medio líquido.
5. Observar al microscopio con los objetivos secos (10X a 60X). Este es un preparado temporal, ya que la muestra se evapora en poco tiempo.
6. Una vez finalizada la observación del preparado microbiológico, desechar el portaobjeto de manera segura. Resulta práctico disponer de una botella plástica de boca ancha para depositar transitoriamente los portaobjetos. Una vez llena, cerrar la botella y descartar.

7.4.2 Preparación de frotis

El objetivo de preparar un frotis es fijar los microorganismos en la superficie de un portaobjeto para posteriormente realizar una coloración (simple o compuesta).

Materiales:

- Ansa en anillo
- Portaobjetos
- Broche o pinza de madera
- Mechero Bunsen

Procedimiento:

1. Extendido: limpiar un portaobjeto y desengrasarlo con alcohol, luego esparcir la muestra sobre un portaobjeto. Si se utiliza crema de levadura colocar una pequeña por-

ción con un ansa estéril y agregar una gota de agua. Disgregar el material con un ansa en anillo y esparcir en una fina capa sobre el vidrio (si la suspensión es muy concentrada resultará en preparados de difícil observación).

2. Secado: con ayuda de un broche de madera, tomar el portaobjeto y agitar suavemente en la columna de aire caliente que genera la llama del mechero (evitar el contacto directo con la llama y la ebullición del agua del frotis).

3. Fijado: Con ayuda de un broche de madera, pasar rápidamente el portaobjeto tres veces por la llama del mechero con la muestra hacia arriba. El portaobjeto debe notarse caliente, pero no debe quemar cuando se coloca en la parte posterior de la mano. Este procedimiento mata y adhiere los microorganismos al portaobjeto, si no se realiza correctamente las células se lavan y se pierde la tinción.

7.4.3 Coloración simple con Azul de Metileno

La coloración simple utiliza un solo colorante, en este caso el azul de metileno, que facilita la observación de bacterias a través del microscopio. El azul de metileno actúa rápidamente sobre todas las células bacterianas y no produce un color tan intenso que oscurezca los detalles celulares. Esta técnica utiliza solución de azul de metileno a una concentración del 1%, mucho mayor a la que se utiliza para determinar viabilidad de levaduras. Importante: Se deben rotular adecuadamente ambas soluciones para evitar confusiones.

Materiales:

- Azul de Metileno
- Matraz aforado de 50 mL
- Balanza
- Cuchara/espátula para laboratorio
- Frasco de vidrio color ámbar de 70 mL con tapa
- Piseta con agua destilada
- Materiales necesarios para realizar un frotis
- Soporte para tinciones
- Recipiente plástico
- Aceite de inmersión
- Microscopio óptico con aumento 1000X

Procedimiento para preparar solución de azul de metileno para coloración (1%):

1. Colocar 0,5 g de Azul de Metileno en un matraz aforado de 50 mL y agregar aproximadamente 25 mL de agua destilada.
2. Agitar hasta que el azul de metileno esté completamente disuelto.
3. Agregar agua destilada hasta llegar al nivel del cuello del matraz, con ayuda de una piseta completar los últimos centímetros hasta llegar al nivel de aforo.
4. Trasvasar al frasco de vidrio color ámbar.

Procedimiento para la coloración con Azul de Metileno:

1. Tomar una muestra del material a testear y realizar un frotis (por ejemplo una colonia bacteriana desarrollada en una caja de Petri).
2. Colocar el frotis sobre un soporte para tinciones y por debajo un recipiente para evitar teñir la pileta del laboratorio (Figura 7.3).
3. Cubrir el frotis con solución de Azul de Metileno y dejar actuar por 1 minuto.

4. Lavar suavemente con agua corriente con la ayuda de una piseta.
5. Secar el extendido con la corriente de aire caliente del mechero (evitar el contacto directo con la llama, una temperatura excesiva arruinará el preparado).
6. Observar con microscopio óptico a 400X. Luego cubrir el frotis con una gota de aceite de inmersión y observar con aumento 1000X.
7. Resultados: registrar presencia o ausencia de microorganismos. En caso de presencia, reconocer forma, tamaño y frecuencia con la que se observa en el preparado.



Figura 7.3: Portaobjetos en un soporte para tinciones sobre un recipiente plástico.

7.4.4 Coloración de Gram

Las bacterias de acuerdo a la composición y estructura de las paredes se pueden clasificar en Gram positivas (G+) y Gram negativas (G-). Esta clasificación tiene importancia como una primera prueba para diferenciar grupos de microorganismos. Las G+, retienen el primer colorante (cristal violeta o violeta de Genciana) y se observan violetas. Las G-, no retienen el primer colorante cuando se les aplica un decolorante formado por una mezcla de alcoholes y se tiñen con el segundo colorante (safranina), por lo tanto se ven rosadas.

Materiales:

- Materiales necesarios para realizar un frotis
- Soporte para tinciones
- Recipiente plástico
- Broche o pinza de madera
- Kit para tinción de Gram (solución de violeta de genciana, lugol, decolorante para Gram y solución de safranina)
- Piseta con agua
- Aceite de inmersión
- Microscopio óptico con aumento 1000X

Procedimiento:

1. Realizar un frotis con la muestra deseada (ejemplo colonia desarrollada en una caja de Petri, muestra de cerveza o crema de levaduras) colocarlo sobre un soporte para tinciones en un recipiente para evitar teñir la piletta del laboratorio (Figura 7.3).
2. Cubrir el frotis con Violeta para Gram y dejar actuar 20 segundos.
3. Lavar suavemente con agua con la ayuda de una piseta durante 10 segundos.
4. Cubrir con Lugol y dejar actuar 30 segundos.
5. Lavar.

6. Cubrir con decolorante para Gram y dejar actuar 10 segundos.
 7. Lavar.
 8. Cubrir con Safranina para Gram y dejar actuar 20 segundos (Figura 7.4).
 9. Lavar.
 10. Secar el extendido con la corriente de aire caliente del mechero (evitar el contacto directo con la llama, una temperatura excesiva arruinará el preparado).
 11. Observar con microscopio óptico a 400X. Luego cubrir el frotis con una gota de aceite de inmersión y observar con aumento 1000X.
 12. Resultados: las bacterias Gram positivas se observan de color violáceo, y las bacterias Gram negativas se observan de color rosado-rojizo.
- NOTA:** para el lavado se puede utilizar agua destilada o corriente, en todos los casos se debe realizar suavemente durante 10 segundos con ayuda de una piseta.



Figura 7.4: Tinción de Gram.

7.4.5 Viabilidad de levaduras por el método de tinción con Azul de Metileno

Este método permite estimar la proporción de células vivas de levadura en muestras de diferente origen (cerveza en fermentación, crema de levadura o levadura propagada). En este caso está planteada una concentración de azul de metileno de 0,01% pero otros autores como Libkind Frati (2018) indican que ese valor es de referencia y que han obtenido mejores resultados con una solución más diluida (0,001%). Esta técnica es precisa para muestras de levadura con alta viabilidad, por lo que no es recomendable para muestras almacenadas por mucho tiempo.

Materiales:

- Azul de metileno
- Matraz de 1000 mL
- Balanza
- Cuchara/espátula de laboratorio
- Frasco de vidrio color caramelo de 1000 mL con tapa
- Piseta con agua destilada
- Porta y cubreobjetos
- Micropipeta automática de volumen variable 100 - 1000 μ L (P1000)
- Tips o puntas azules para micropipeta
- Tubos de ensayo

- Gradilla para tubos de ensayo
- Microtubos de 2 mL (tipo Eppendorf)
- Pipeta de Pasteur
- Microscopio óptico

Procedimiento para preparar solución de azul de metileno para viabilidad (0,01%):

1. Disolver 0,1 g de Azul de Metileno en un matraz aforado en 500 mL de agua destilada, agitar hasta que esté completamente disuelto.
2. Agregar agua destilada con ayuda de una piseta hasta llegar al nivel de aforo.
3. Trasvasar al frasco de vidrio color caramelo y almacenar en heladera por un lapso no mayor a 6 meses.

Procedimiento para determinar viabilidad de levaduras:

1. Mezclar en el microtubo 1 mL de la solución de azul de metileno para viabilidad con 1 mL de la muestra de levaduras o su dilución.
2. Colocar una gota de la solución anterior sobre un portaobjetos con una pipeta de Pasteur, cubrir con cubreobjetos y evitar que queden burbujas de aire entre ambos vidrios.
3. Observar al microscopio (aumento de 400X). La concentración debe ser entre 40 y 60 células por campo del microscopio. Si el número de células es mucho mayor, realizar diluciones de la muestra de levaduras para facilitar la visualización.
4. Examinar al menos 500 células. **IMPORTANTE:** no se deben considerar los brotes, es decir las células hijas que aún no se han separado, excepto si su tamaño es mayor a la mitad de la célula madre.
5. La viabilidad se calcula como el porcentaje de células no teñidas o de color azul claro (las células muertas aparecen de color azul oscuro) según la siguiente fórmula:

$\text{Viabilidad (\%)} = \frac{(CT - CM)}{(CT * 100)}$	<p>donde:</p> <p>CT: Células totales contabilizadas</p> <p>CM: Células muertas</p>
---	--

7.4.6 Cámara de Neubauer

Una cámara de Neubauer (Figura 7.5) es un tipo especial de portaobjetos de uso habitual en medicina, biología y microbiología, permite realizar recuentos de esporas y células en un medio líquido. En el caso particular de microbiología cervecera, se lo utiliza para contar células de levadura de una muestra.

Esta cámara de recuento está adaptada al microscopio de campo claro, consiste en un portaobjetos que tiene dos zonas ligeramente deprimidas (hemicámaras) que permiten hacer dos recuentos simultáneos, en cuyo fondo se ha marcado una cuadrícula de dimensiones conocidas. La cámara se cubre con un cubreobjetos especial denominado cubrecámara (de mayor espesor que un cubreobjetos común) que se adhiere por los laterales humedecidos por acción de la tensión superficial.

El líquido con las células a contar se introduce por capilaridad entre la cámara y el cubrecámara, previa dilución. Se observa la retícula (cuadrícula) al microscopio con el aumento adecuado y se cuentan las células. A partir del número de células contadas y del volumen de líquido que admite la hemicámara, se calcula la concentración de células (CC) en la muestra líquida aplicada.

La retícula de la Cámara de Neubauer está compuesta por cuadros (recuadros, cuadrados) de tres tamaños diferentes: cuadros grandes, medianos y pequeños. Una Cámara tradicional posee 9 cuadros grandes (de 1 mm²). El cuadro grande central se denomina área de recuento y es la zona donde se contabilizan las células de levadura. El área de recuento contiene 16 cuadros medianos y cada uno de ellos está subdividido en 16 cuadros pequeños. Existe una Cámara de Neubauer mejorada (Improved) a la que se le han realizado cambios en las líneas triples de división y en lugar de 16 cuadros medianos posee 25 (Figura 7.6).

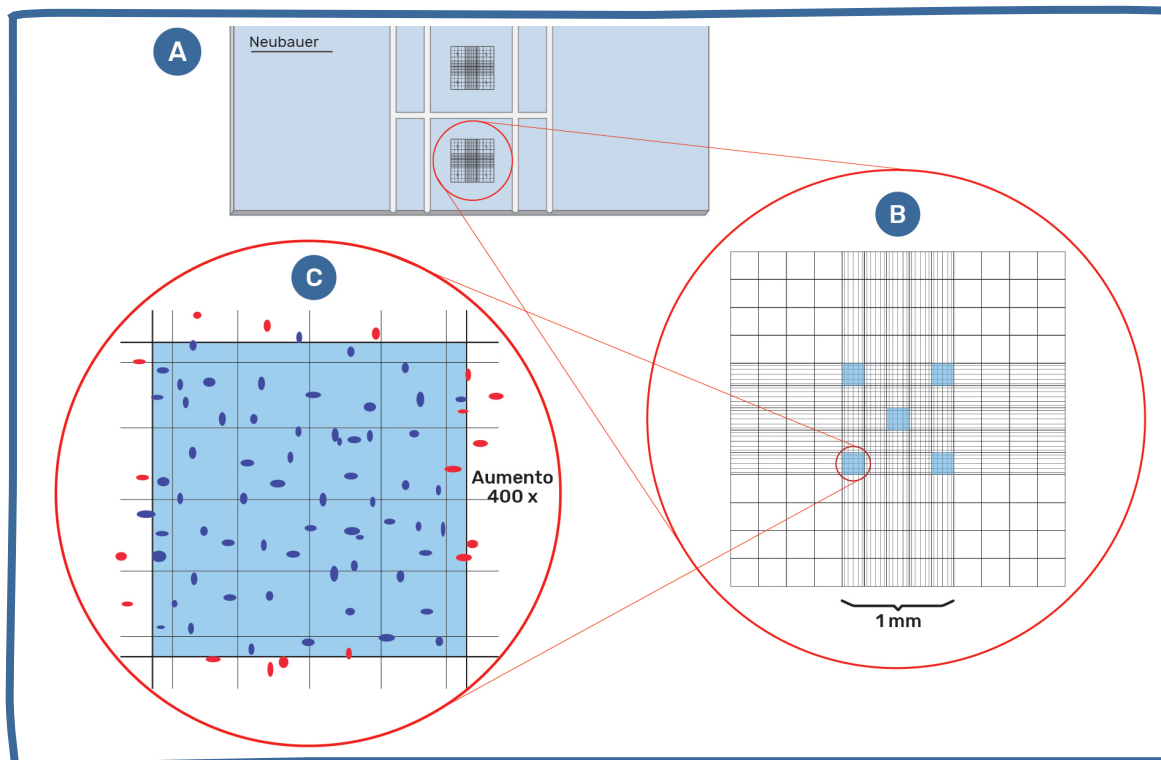


Figura 7.5: (A) Representación de una Cámara de Neubauer Improved. (B) Retícula de la cámara. (C) Aumento 400X cuadro mediano con presencia de células de levadura.

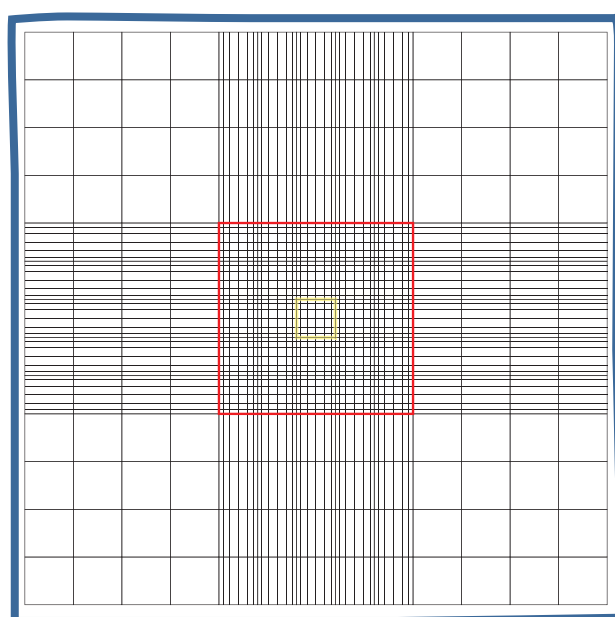


Figura 7.6: Retícula de Cámara de Neubauer Improved. En color rojo se delimita el área de recuento (cuadro grande), en color amarillo uno de los 25 cuadros medianos.

7.4.6.1 Recuento de levadura con Cámara de Neubauer

Uno de los métodos de conteo o recuento de células de levadura es a través del uso de un microscopio, una Cámara de Neubauer y algunos elementos básicos de laboratorio. Este método permite visualizar las células de levadura directamente y también a través de una tinción simple se puede determinar la viabilidad. Conociendo esta información, es posible estandarizar el inóculo de levadura en la elaboración de cerveza. A continuación se propone un método:

Materiales:

- Microscopio óptico
- Cámara de Neubauer *Improved*
- Cubrecámara
- Micropipeta automática de volumen variable 100 - 1000 μL (P1000)
- *Tips* o puntas azules para micropipeta
- Recipiente limpio
- Tubos de ensayo
- Gradilla para tubos de ensayo
- Microtubos de 2 mL (tipo Eppendorf)
- Agua destilada o mosto de cerveza 1030 kg/m^3

Toma de muestra:

1. Antes de tomar la muestra se debe homogenizar la biomasa para que la concentración de levadura sea uniforme. Es importante que la muestra sea representativa para obtener resultados.
2. La muestra se debe tomar de manera aséptica para evitar la contaminación de la fuente. Rociar la válvula o tomamuestra con alcohol 70% o ácido peracético y dejar actuar un minuto.
3. Utilizar un recipiente para tomar una pequeña muestra de la fuente y volver a rociar la válvula o tomamuestra. El recipiente para tomar la muestra puede ser un simple vaso bien limpio ya que no se utilizará para elaborar cerveza.

Dilución de la muestra:

1. El conteo de células en una cámara de Neubauer requiere dilución previa de la muestra según se indica en ítem 5.8.2. Es importante agitar la muestra para eliminar todo el gas y lograr una correcta homogenización. Además, el agua destilada de los tubos de ensayo se puede reemplazar por mosto, esto ayuda a separar las células y tener una fácil visualización. En la tabla 7.1 se indican diluciones para obtener la concentración de células adecuada que sirven como referencia.
2. También se puede realizar el análisis de viabilidad, para esto se deberá agregar partes iguales de solución de azul de metileno para viabilidad y de la dilución adecuada de muestra (Ver ítem 7.4.5). Por ejemplo: si se desea realizar un recuento y viabilidad de levaduras con una dilución de 1:200 se debe obtener una dilución de la muestra a 1:100.
3. Tomar un microtubo colocar 1 mL de solución de azul de metileno y 1 mL de la dilución 1:100 de la muestra de levaduras. Homogeneizar con vortex antes de cada transferencia, de esta manera se obtiene una dilución final de 1:200 que será utilizada para cargar la Cámara de Neubauer.

Tabla 7.1: diluciones recomendadas según tipo de muestra. Carga de la Cámara de Neubauer:

TIPO DE MUESTRA	DILUCIÓN
Cerveza	-
Cerveza en fermentación	1:10 a 1:100
Crema de levadura	1:200 a 1:1000

4. Lavar la cámara y el cubrecámara con alcohol 96%. Si es necesario, lavar con agua destilada con una gota de detergente y secar con papel absorbente suave sin frotar.
5. Acoplar el cubrecámara a presión con los bordes humedecidos hasta que se formen patrones de anillos concéntricos con los colores del arcoíris llamados anillos de Newton. El cubrecámara deberá recubrir las dos hemicámaras (zonas de recuento).
6. Tomar una porción de la dilución correspondiente con pipeta Pasteur. Apoyar la punta de la pipeta en el borde del cubrecámara, en el extremo de una de las zonas de recuento, el líquido debe ingresar en la hemicámara por capilaridad desde el lateral a la zona de recuento.
7. **IMPORTANTE:** En caso de exceso de líquido, presencia de burbujas o si se movió el cubrecámara, repetir el proceso de carga de la Cámara de Neubauer nuevamente.

Recuento mediante microscopio óptico:

1. Enfocar el área de recuento según las indicaciones del ítem 7.3.
2. Contar sólo cinco cuadros medianos cuando la distribución de las células en el área de recuento (cuadro grande) sea uniforme; cuando la distribución no es uniforme hacer el recuento de todos los cuadros medianos (16 cuadros para el caso del modelo tradicional o 25 cuadros medianos para la cámara mejorada).
3. Para realizar el conteo localizar el primer cuadro mediano y contar según se describe seguidamente (**IMPORTANTE:** se debe preparar una nueva muestra con una dilución acorde si la cantidad de células no se encuentra en el rango de 20 a 100 células por cuadro mediano). Pocas células pueden no ser representativas de la muestra original y por otra parte demasiadas células pueden ser difíciles de contar y se puede incurrir en errores de conteo. La cantidad óptima es de 40 o 50 células por cuadro mediano aproximadamente. De todas formas, si la cantidad de células es de 20 a 100 por cuadro mediano, contar los restantes 4 cuadrados medianos (Figura 7.7).

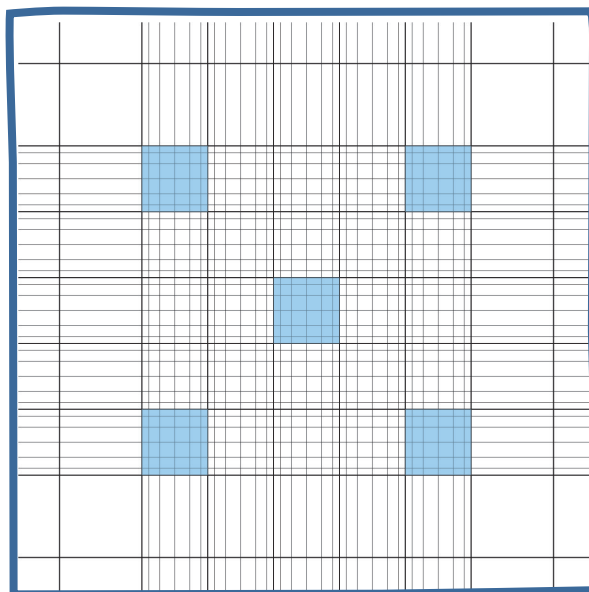


Figura 7.7: Representación del área de recuento de una Cámara de Neubauer Improved, en color celeste se indica los cinco cuadros medianos que se deben contar.

Consideraciones generales para el recuento:

- Las células hijas se contabilizan sólo si al menos alcanzan la mitad del tamaño que la célula madre.
- No se deben contar las levaduras que tocan las líneas inferior y derecha que delimitan el cuadro mediano (línea central de la triple línea). En la Figura 7.5 (C) se puede observar un ejemplo de recuento donde se contabilizan las células representadas en azul y no se contabilizan las células representadas en rojo.
- Cuando se realice simultáneamente la prueba de viabilidad de levaduras discriminar entre células vivas y muertas y calcular el porcentaje de células vivas (se considera célula viva o viable cuando se visualiza incolora o celeste/azul claro).

Cálculo de concentración de células:

1. Calcular las células totales contenidas en el cuadro grande central (CTCC). Si se contabilizaron todos los cuadros medianos (16 o 25 cuadros) realizar la suma para obtener el total. Cuando el recuento se haya realizado en cinco cuadros medianos, se deben sumar entre sí y multiplicarlo por 5 (para el caso de una Cámara de Neubauer mejorada).
2. Calcular el número de células por mL de muestra. Se debe multiplicar la cantidad total de células contenidas en el cuadro grande por 10.000, ya que el volumen de líquido contenido en la Cámara de Neubauer es de 1/10.000 mL.
3. En caso de haber realizado alguna dilución, el número de células por mL debe multiplicarse por el factor de dilución como indica la fórmula:

$$CC = CTCC * 10.000 * FD$$

donde:

CC (cél/mL): Concentración de células de levadura de la muestra.

CTCC: Células totales contenidas en el cuadro grande central.

FD: factor de dilución.

7.4.6.2 Cantidad de levadura necesaria para inocular un fermentador

Para realizar este cálculo son necesarios ciertos datos de la levadura como viabilidad (%), concentración de células en la muestra (cél/mL) y la tasa de inoculación (Ver ítem 4.4). En la práctica cotidiana resulta más fácil trabajar con unidades de masa, es decir transformar mililitros (mL) y litros (L) a gramos (g) y kilogramos (kg) respectivamente. En el caso de las cremas de levadura de 1×10^9 células/mL una aproximación razonable es $1 \text{ L} = 1 \text{ kg}$.

La siguiente fórmula se sugiere para calcular el volumen de crema de levaduras a inocular en un fermentador:

$VC = \frac{NC}{CC * V * 0,01}$	donde: VC: Volumen de crema de levaduras a inocular (mL) CC: Concentración de células de levaduras de la muestra (cél/mL) V: Viabilidad de la muestra de levaduras (%) NC: Células totales (Ver ítem 4.4)
---------------------------------	---

Ejemplo:

Para inocular 1200 L de mosto de 11 °P con levadura Ale (1.200.000 mL), cuya tasa de inoculación es de 0,75 millones de células de levadura por mililitro de mosto por grado plato (Ver ítem 4.4) donde la crema de levadura posee una concentración de $1 \cdot 10^9$ (cél/mL) y una viabilidad del 92% el volumen de crema de levaduras a inocular será:

$\text{Número de células de levadura a inocular} = 0,75 \cdot 10^6 \text{ células} * 1.200.000 \text{ mL} * 11 \text{ °P}$
--

$\text{Número de células de levadura a inocular} = 9\ 900\ 000\ 000\ 000$

Como es un número extremadamente grande, se puede expresar con notación científica (Ver anexo 2):

$\text{Número de células de levadura a inocular} = 9,9 \cdot 10^{12}$

Entonces, el volumen de crema de levaduras a inocular es:

$VC = \frac{NC}{CC * V * 0,01}$ $VC = \frac{9,9 \cdot 10^{12} \text{ (cél.)}}{1.10^9 \text{ (cél/mL)} * 92 \text{ (\%)} * 0,01}$ $VC = 10.761 \text{ mL} = 10,76 \text{ L}$	donde: VC: Volumen de crema de levaduras a inocular (mL) CC: Concentración de células de levaduras de la muestra (cél/mL) V: Viabilidad de la muestra de levaduras (%) NC: Células totales (Ver ítem 4.4)
---	---

Por lo tanto, para este caso hay que inocular 10,76 L de crema de levadura (10,76 kg).

7.4.6.3 Software ImageJ

ImageJ es un programa de procesamiento de imágenes digitales (software libre) desarrollado en el National Institutes of Health. Este programa dispone de un plug-in que detecta automáticamente el número de células a partir de una fotografía tomada con un microscopio y permite realizar el conteo de manera rápida y sencilla.

7.4.6.4 Aplicación para celulares *microBrew.AR*

MicroBrew.AR es una aplicación desarrollada por InnQube a pedido del Instituto Andino Patagónico de Tecnologías Biológicas y Geoambientales (IPATEC) el laboratorio de Microbiología Aplicada, Biotecnología y Bioinformática de Levaduras (Mabblev), específicamente diseñada para las necesidades de las cervecerías, posee una interfase amigable e intuitiva que facilita los cálculos y análisis necesarios para optimizar la reutilización de las levaduras cerveceras. Es una aplicación muy completa y gratuita que se puede descargar desde cualquier buscador de aplicaciones.