



# **CURSO TEORICO-PRÁCTICO SOBRE MICROSCOPIA Y RECUENTO DE LEVADURAS PARA PRODUCTORES DE CERVEZA**

INIBIOMA



CONICET  
U N C O

AUTORES:  
Diego Libkind  
Celia Tognetti  
Martin Moliné

Laboratorio de  
Microbiología Aplicada y  
Biotecnología  
Instituto de  
Investigaciones en  
Biodiversidad y  
Medioambiente  
(INIBIOMA), CONICET-  
UNComahue, Bariloche,  
Argentina.

# OBJETIVO DEL CURSO



## ¿Por qué la calidad es importante?

No solo alcanza con tener el número de levaduras apropiado

- 1) Vivas (**Viabilidad**)
- 2) Vitales (**Vitalidad**)

## ¿Por qué estandarizar es importante?

Única manera de obtener un producto de **calidad constante**

# ESTRUCTURA DEL CURSO

## ¿vamos a aprender a.... ?

- Obtener la muestra (criterios y cuidados)
- Diluir la muestra (Uso pipetas)
- Recuento de levaduras utilizando cámara Neubauer (CANTIDAD)
- Evaluación de viabilidad por el método de tinción con azul de metileno (CALIDAD)
- Cálculo tasas de inoculación (ejemplos).

### Fuentes de Levadura:

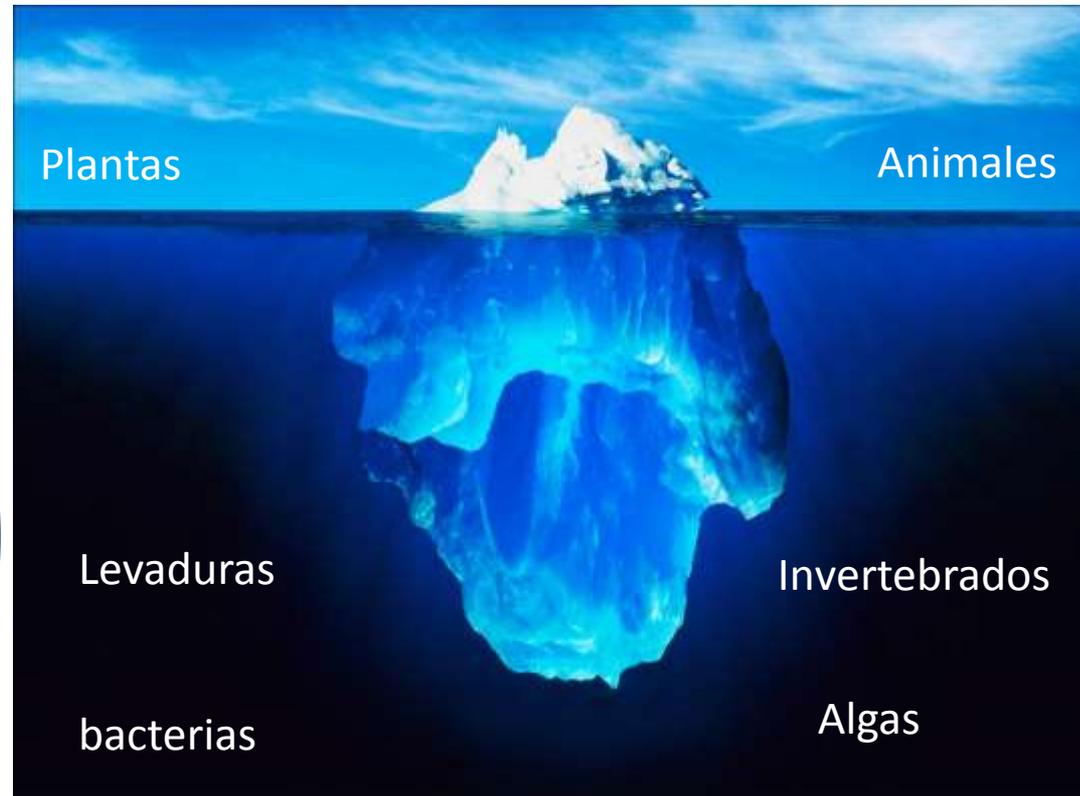
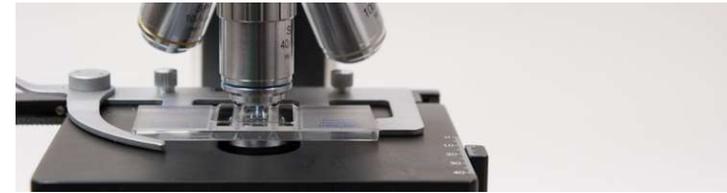
*Crema fresca*

*Crema vieja*



# LEVADURA = MICROORGANISMO

## Mundo Microbiano



Solo conocemos el 5%

INIBIOMA



CONICET  
U N C O



¿Cómo estudiamos aquello que  
no vemos?





# Microscopio óptico

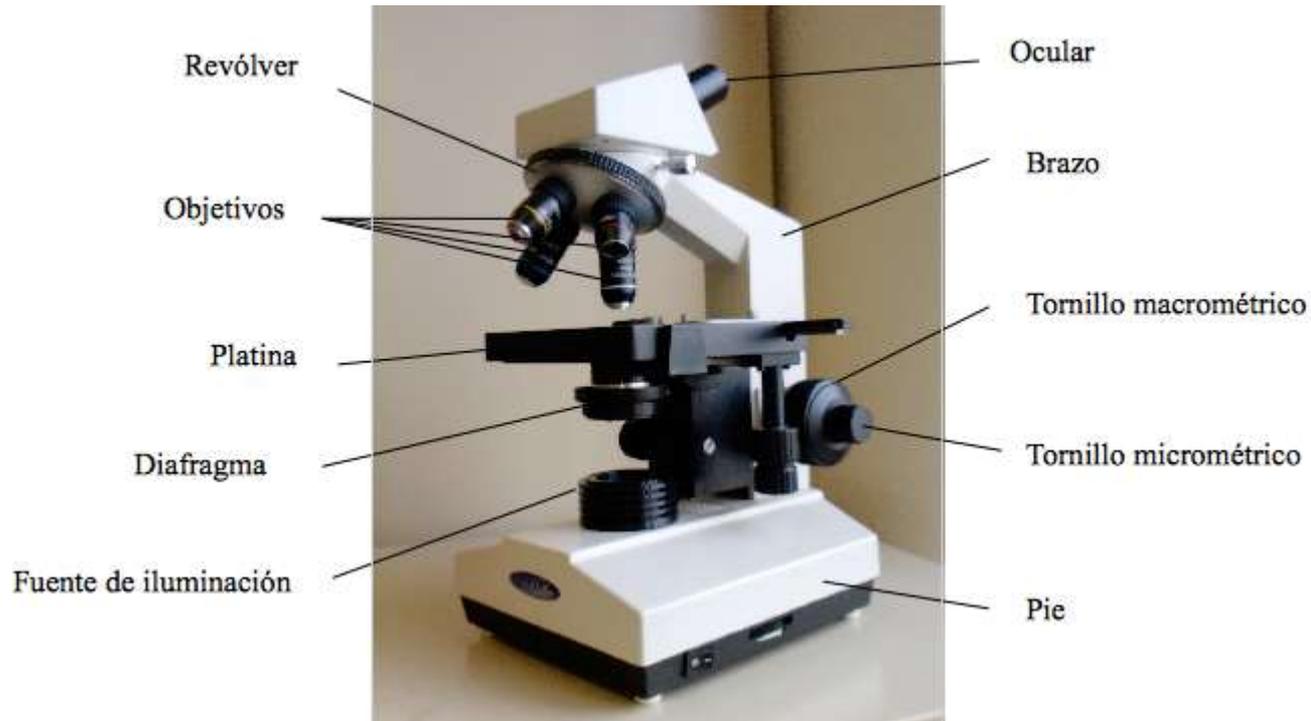


# Microscopio: cuidados básicos

- Resguardar del polvo
- No mover cuando está prendido o caliente
- Transportar adecuadamente

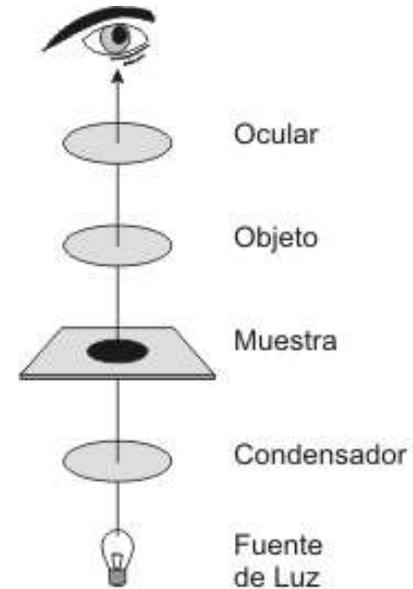


# Microscopio: partes





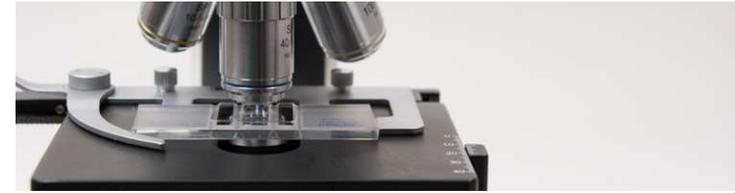
# Microscopio: principios





# Microscopio: material para observación

- Delgado
- Traslúcido

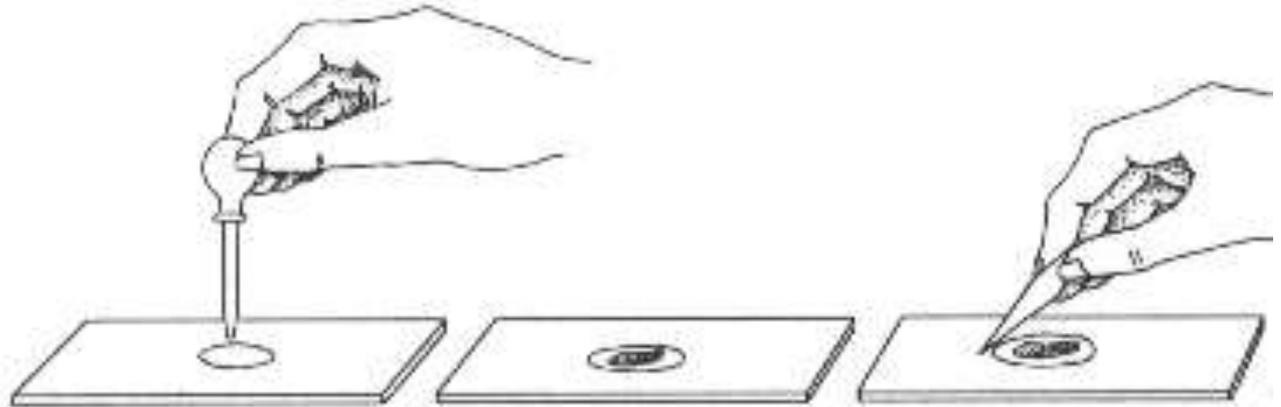


# Microscopio: práctico

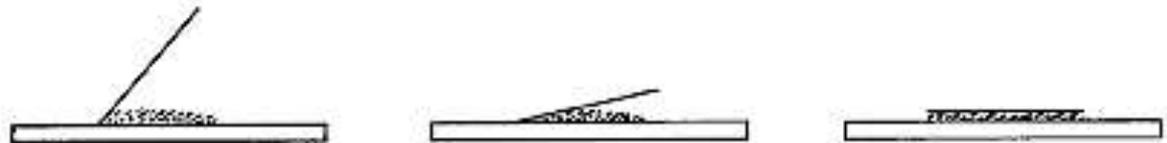
- Realizar un preparado
- Observar el preparado

# Microscopio: realizar un preparado

Preparar la muestra



Colocar cubreobjetos



# Microscopio: enfocar



- Prender fuente luz
- Poner menor aumento
- Poner portaobjetos con muestra, centrar
- Subir platina
- Mirar por ocular, bajar platina hasta enfoque grueso
- Enfoque fino
- Centrar
- Cambiar aumento SIN bajar platina
- Enfoque fino

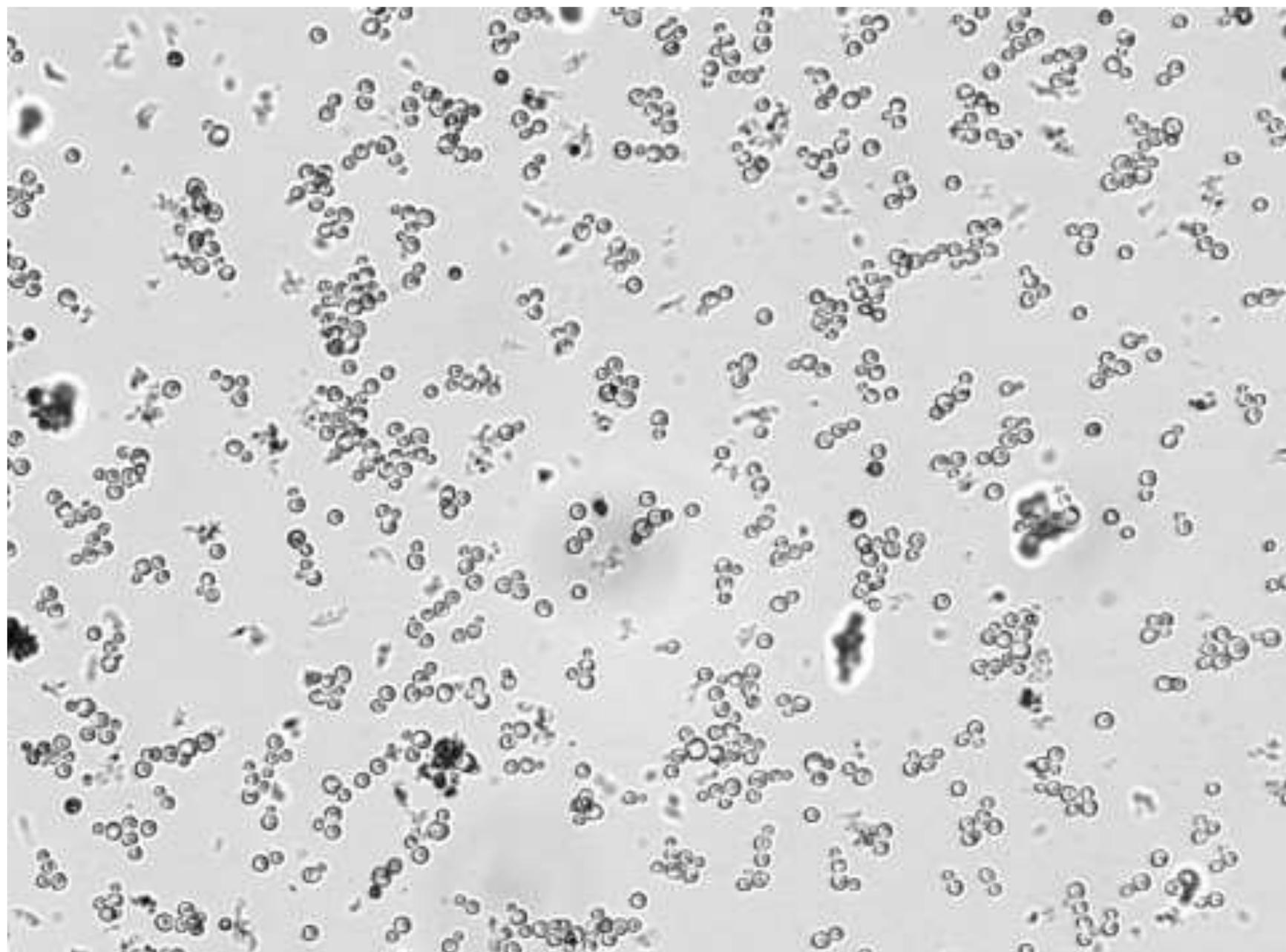
Observación al microscopio!!

INIBIOMA



CONICET

U N C O



# La necesidad de medir

INIBIOMA



CONICET

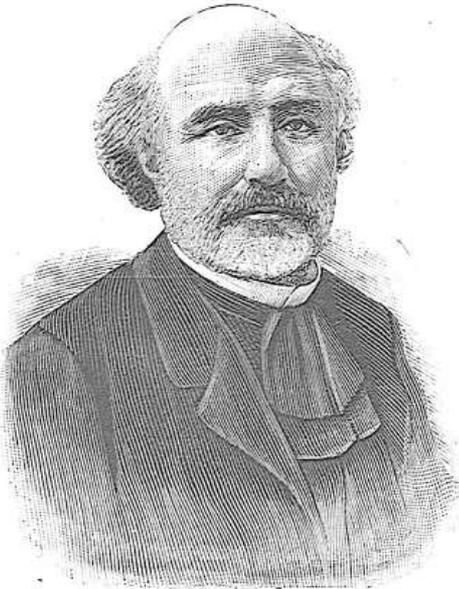
---

U N C O

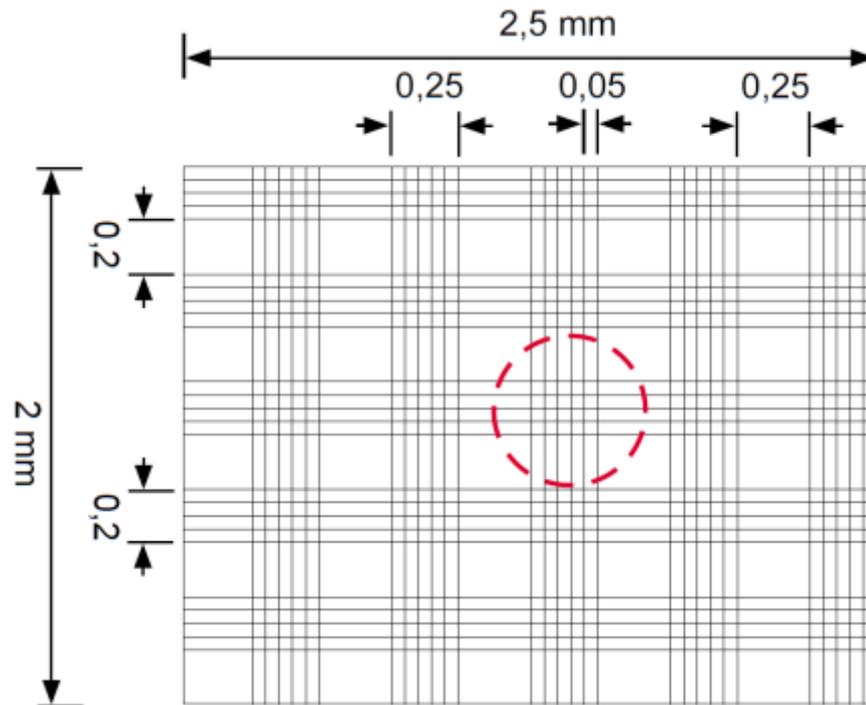
# La necesidad de medir

## Louis-Charles Malassez (1842-1909)

- Reconoció la importancia de contar células en la sangre
- Inventó la primera cámara de recuento (1873)



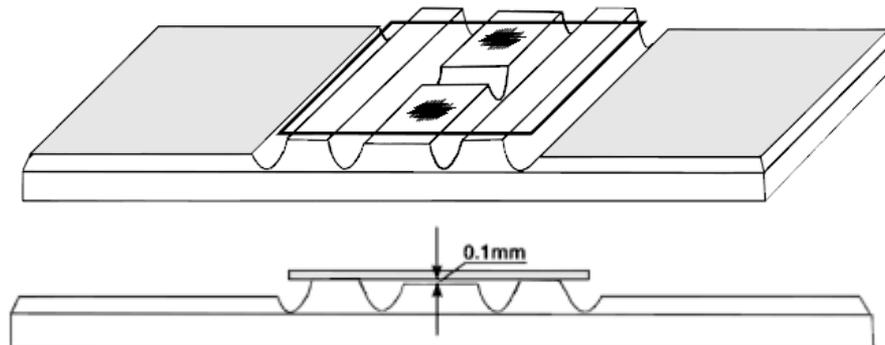
Le docteur Malassez.



# Cámaras de recuento

## ¿Qué es una cámara de recuento?

- un aparato de **precisión** hecho en vidrio **especial**, usado para contar células o partículas.



## La precisión según normas DIN 12847 y DIN 7184

- La profundidad puede desviarse  $\pm 2\%$  del valor nominal
- Las distancias entre líneas pueden desviarse 0,002 mm
- El ancho de la marca tiene que ser menor a 0,005 mm
- El fondo de la cámara tiene que tener una planeidad de 0,002mm y el cubrecámara una planeidad de 0,003mm

# Cámaras de recuento

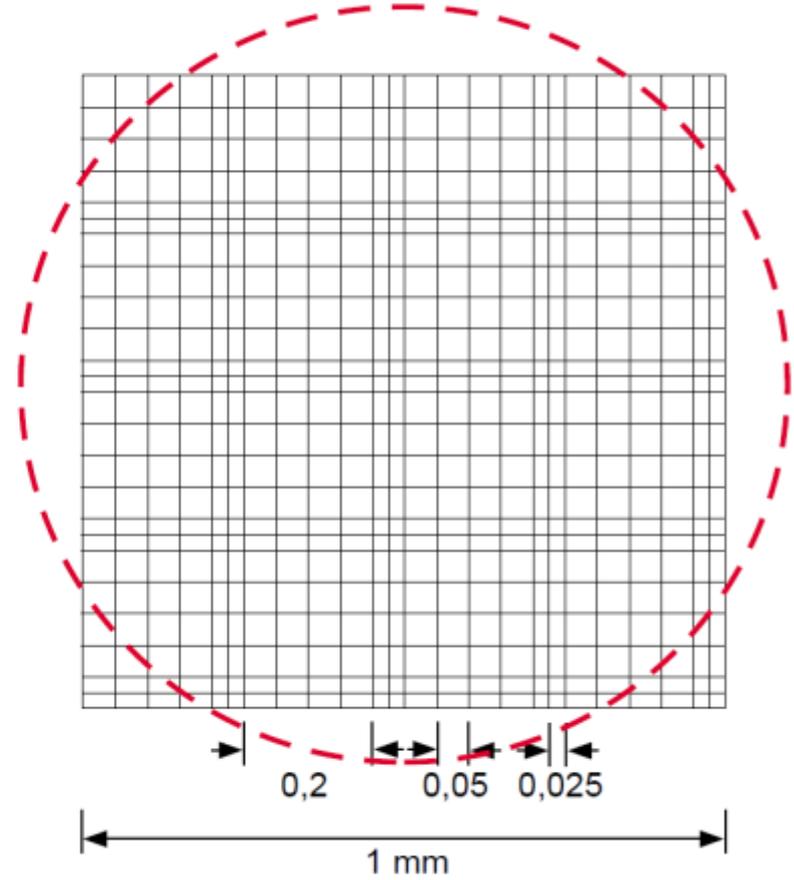
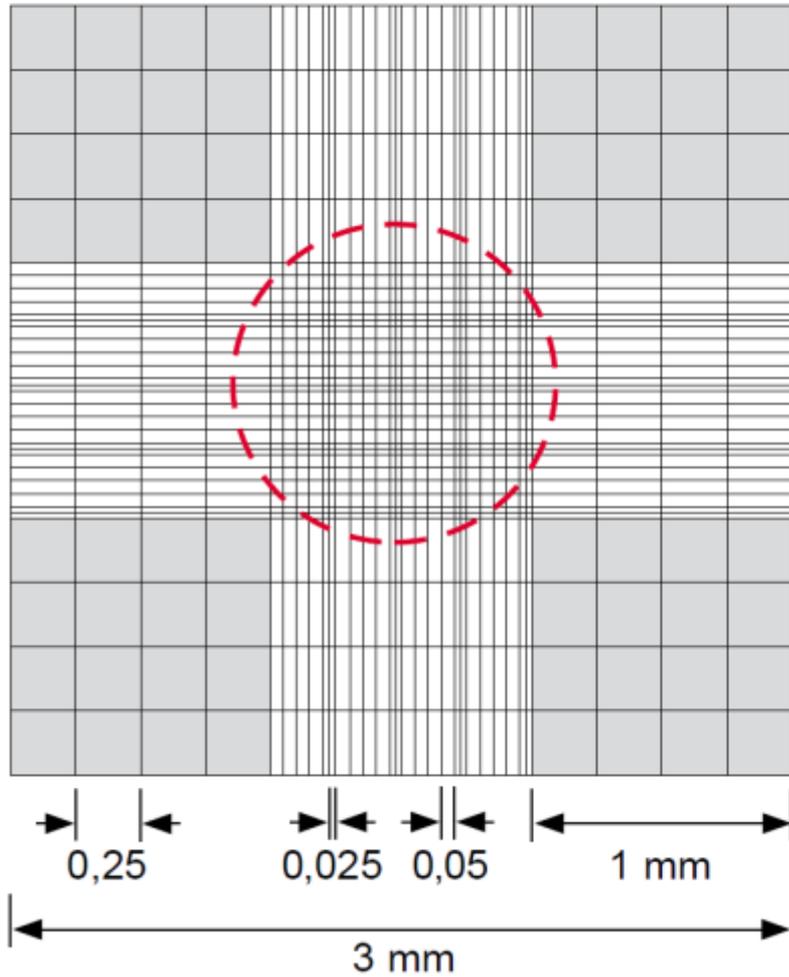
## La cámara de Neubauer

- Existen muchos tipos de cámaras y todas sirven, pero.....



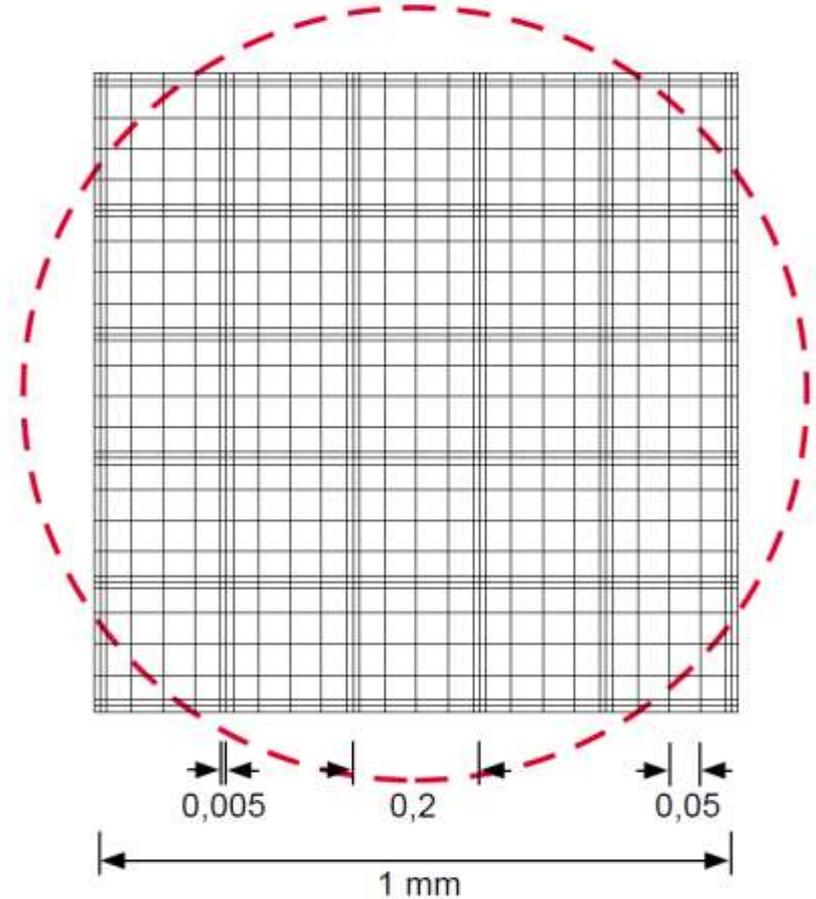
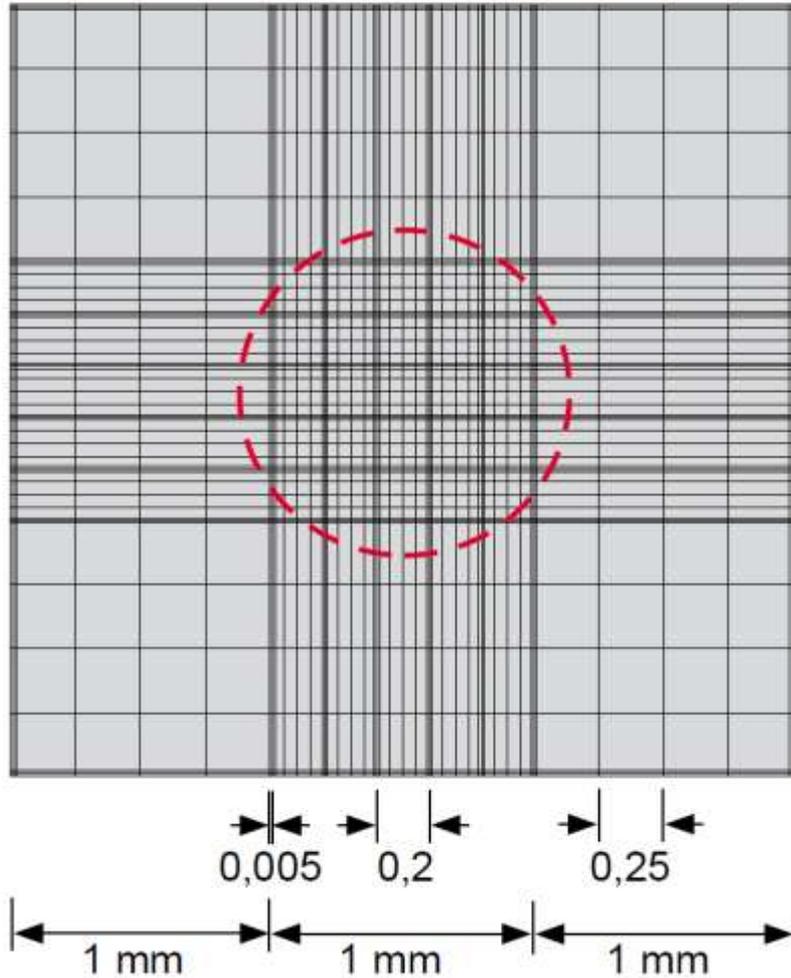
# Cámaras de recuento

Neubauer

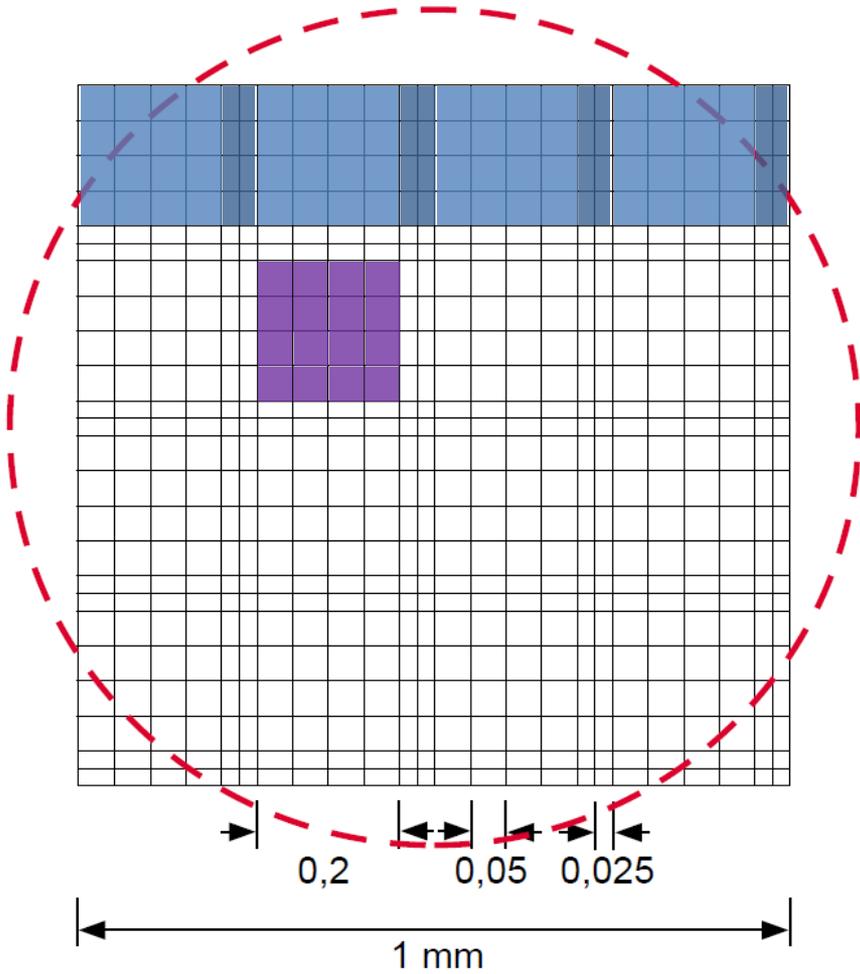


# Cámaras de recuento

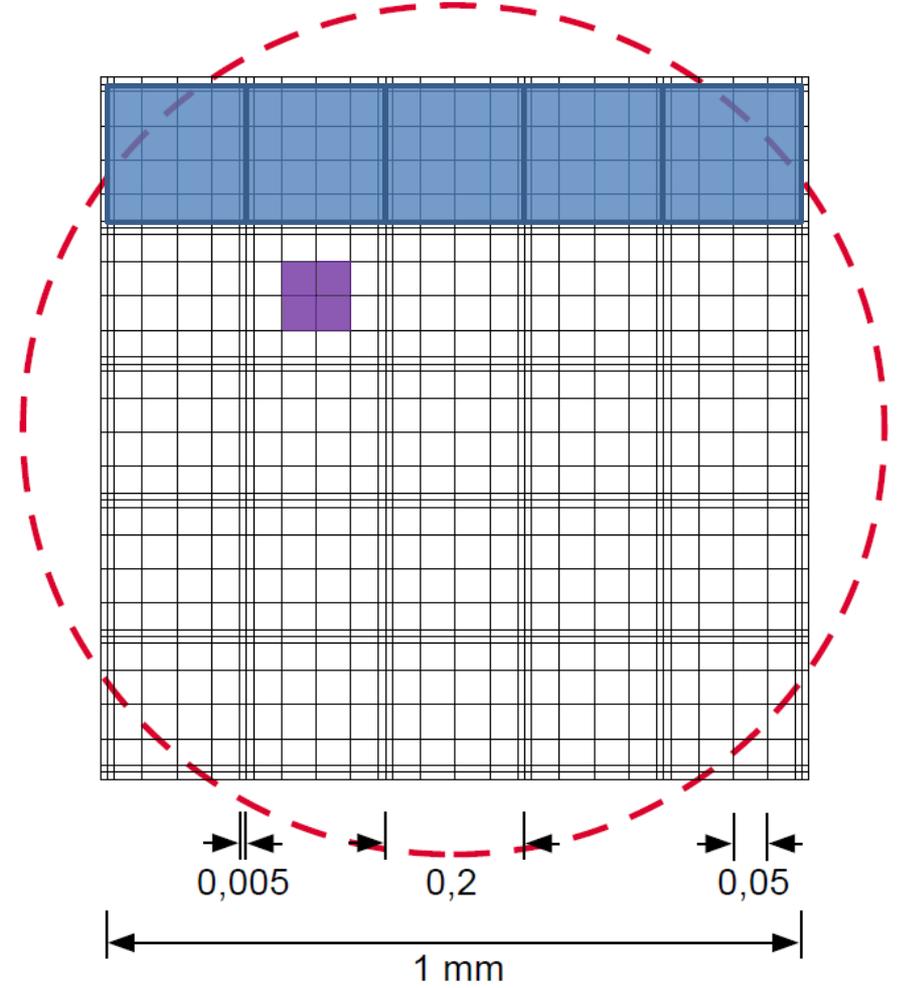
## Neubauer-mejorada con líneas oscuras



# Cámaras de recuento

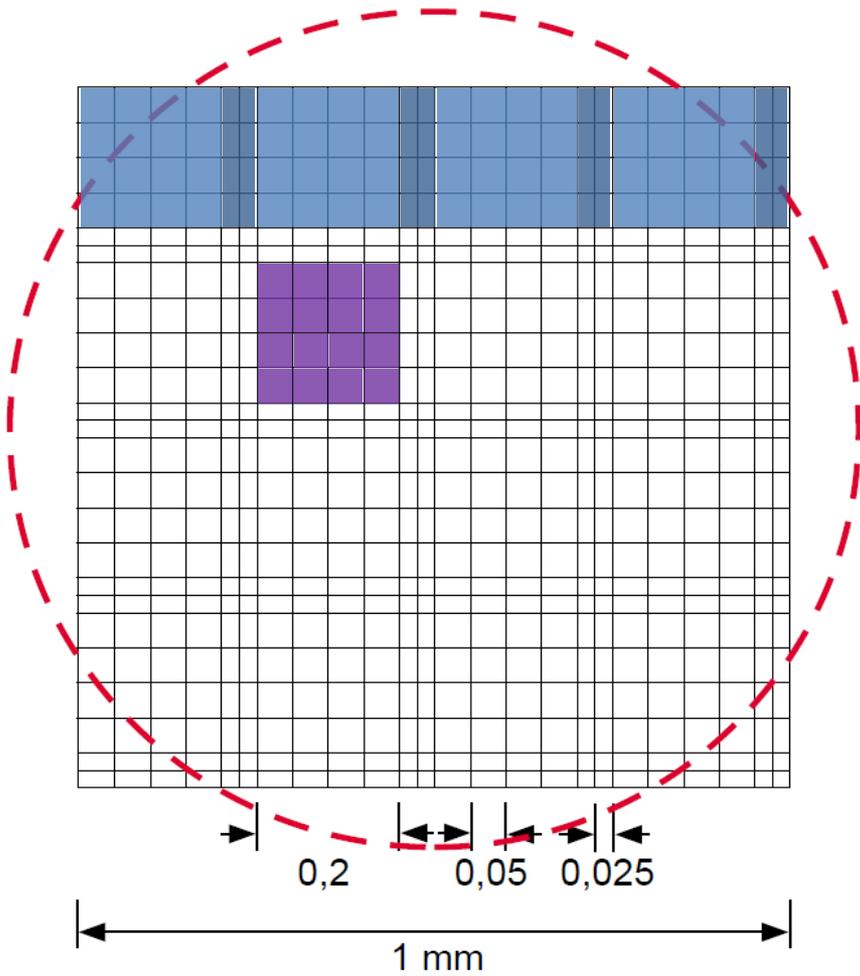


Neubauer

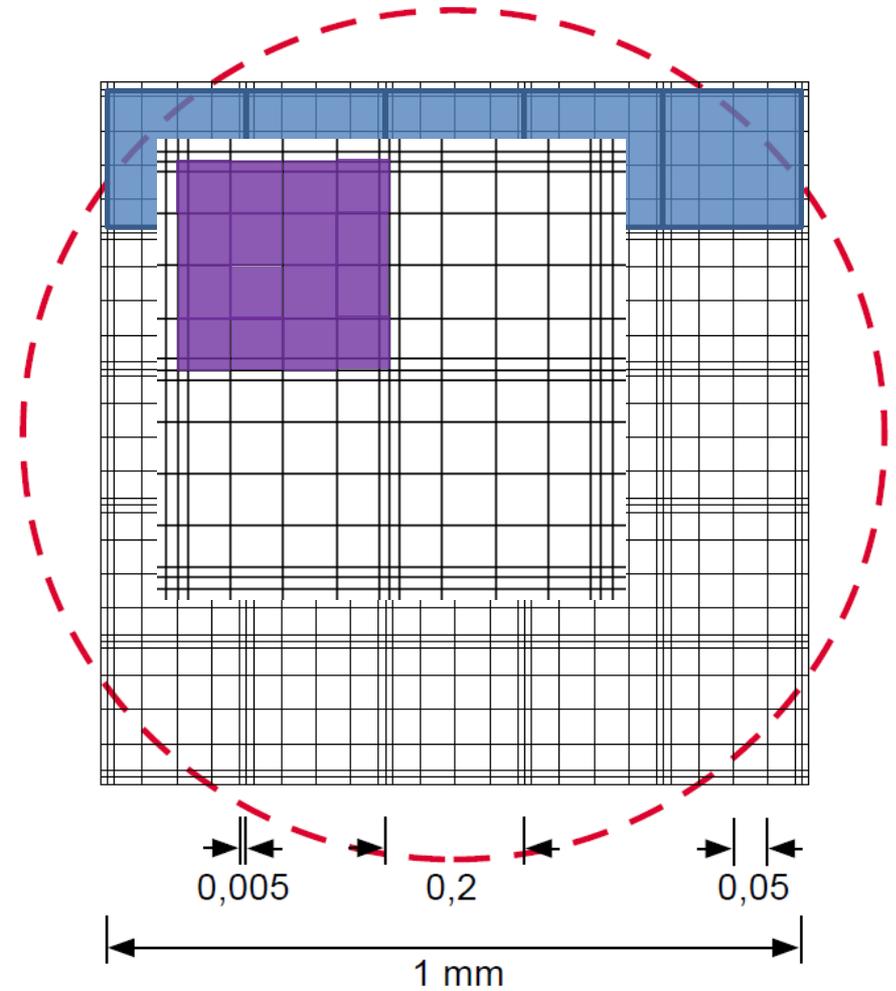


Neubauer - Improved

# Cámaras de recuento



Neubauer

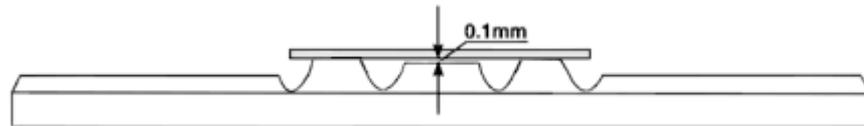


Neubauer - Improved

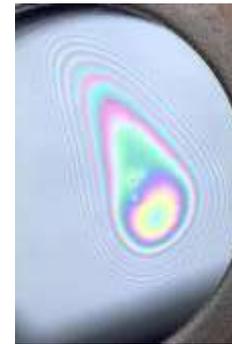
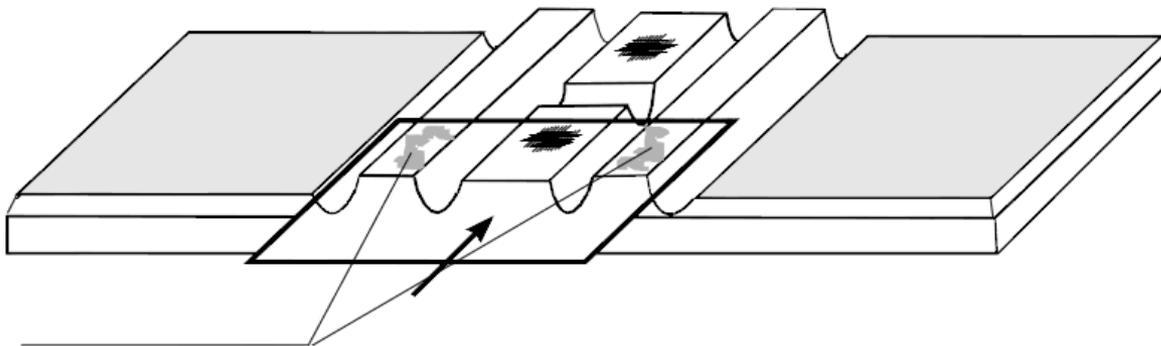
# Cámaras de recuento

## Preparación de la cámara

- Es muy importante que el cubrecámara quede bien colocado.
- **Nunca** usar cubreobjetos comunes



- Se humedece el soporte
- Se desliza el cubrecámara (tienen que formarse anillos de interferencia)



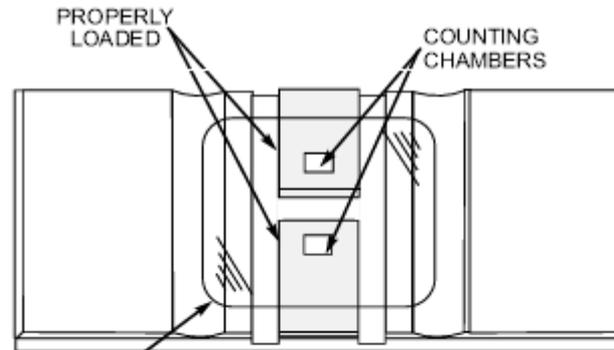
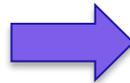
# Cámaras de recuento

## ¿Cómo cargar de la cámara?

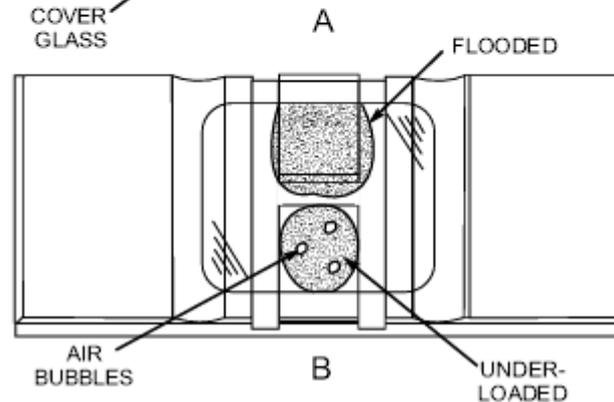
- El cultivo debe estar muy bien homogeneizado
- Se carga la pipeta y se descartan las primeras gotas
- Se coloca la muestra en el espacio entre la cámara y el cubrecámara
- Se espera a que sedimente (ni mucho, ni poco)



Debe quedar así



A



B



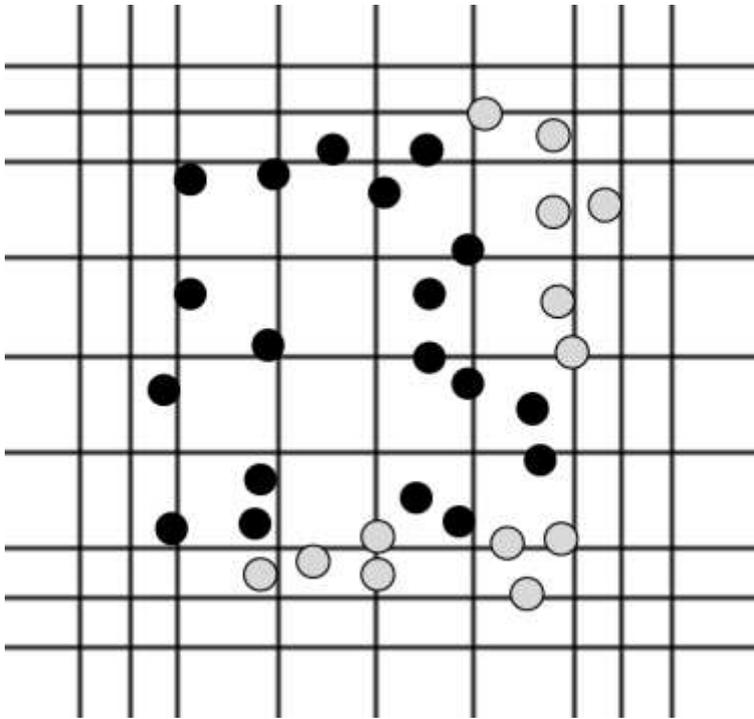
Volver a empezar



# Cámaras de recuento

## Cómo contar

- Lo importante es utilizar siempre el mismo criterio y conocer las dimensiones del retículo



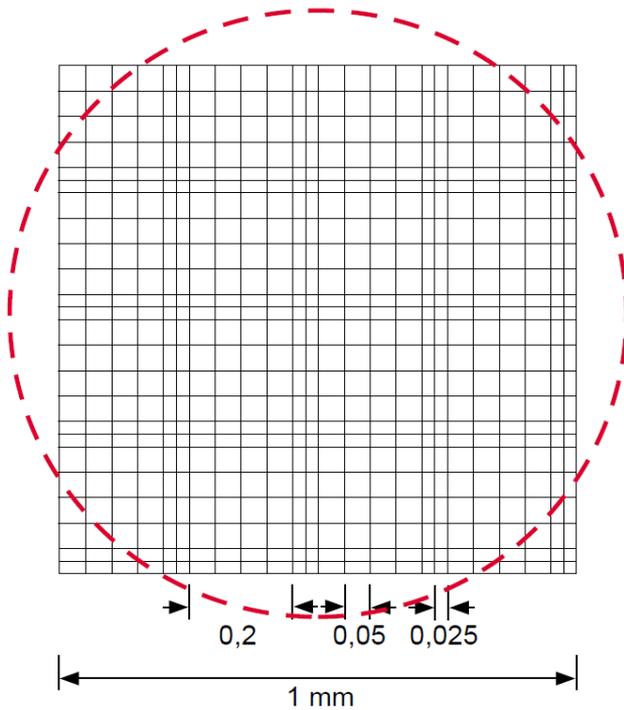
- Debe haber uniformidad en los resultados obtenidos entre los distintos cuadrados
- Debe haber número adecuado de células por cuadrado (ni muchas, ni pocas)
- Se cuentan por duplicado y el número debe ser similar

Células contadas	Error
5	89%
10	63%
15	52%
20	45%
25	40%
30	37%
35	34%
40	32%
45	30%
50	28%
60	26%
70	24%
80	22%
100	20%
150	16%
200	14%
300	12%
500	9%

# Cámaras de recuento

## ¿Cómo hacer los cálculos?

- 1º - Sumar el número de células contadas.
- 2º - Multiplico para obtener cuántas células hay en un volumen final de 1 mL



- 3º - Multiplico por la dilución realizada

Ejemplo:

Si la suma de 5 cuadrados da un total de 300 entonces el total de la cámara (estimado) será de  $300 \times 5 = 1.500$

Las células por ml se estiman en:

$$1.500 \times 10.000 = 15.000.000 = 1,5 \times 10^7$$

Multiplico por factor de dilución ejemplo (1/100) entonces:

$$1,5 \times 10^7 \times 100 = 1,5 \times 10^9 \text{ (billones)}$$

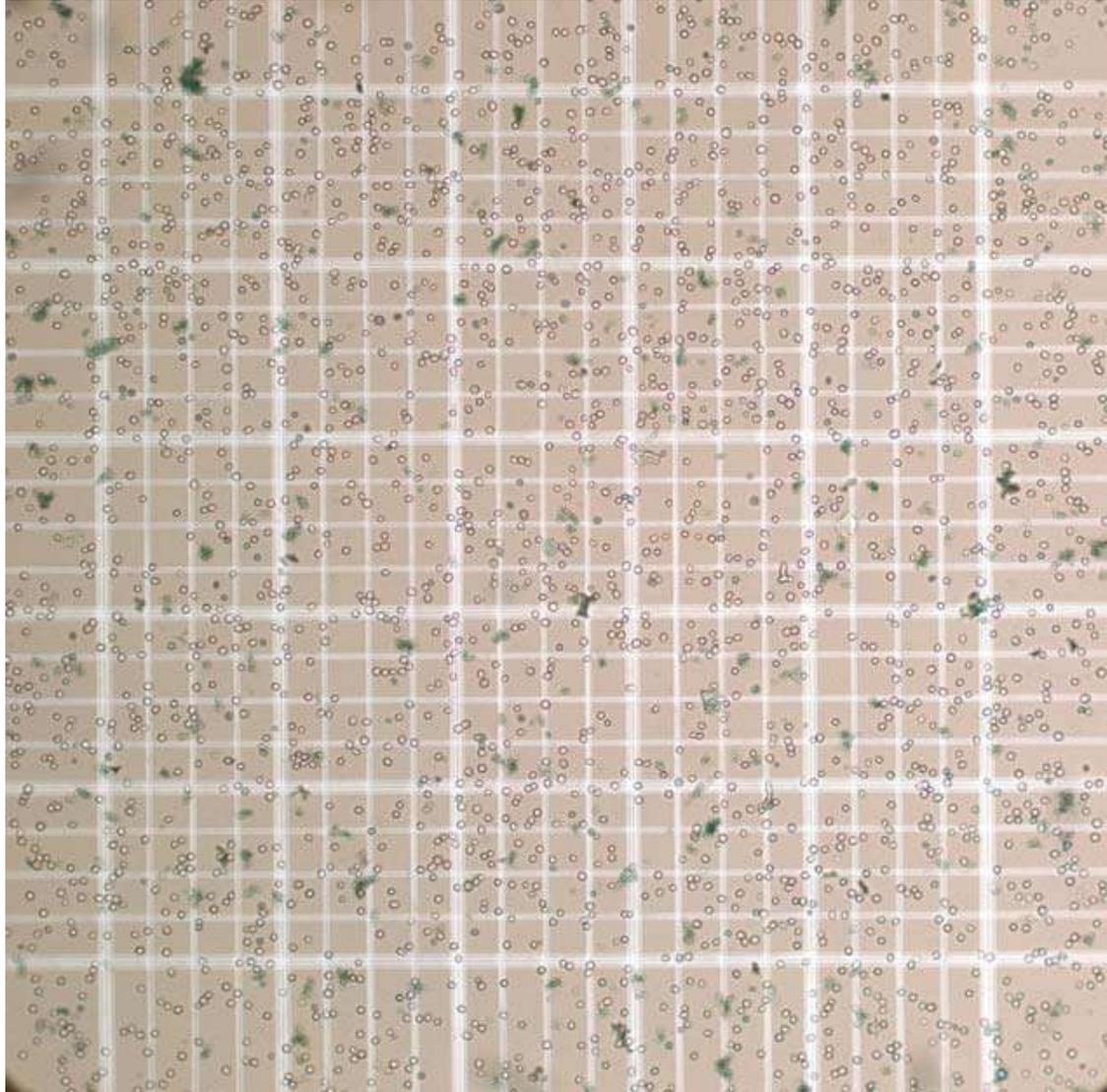
# Cámaras de recuento

## Lo que puede salir mal

- Tomar mal la muestra
- Armar o cargar incorrectamente la cámara
- Tamaño de muestra inadecuado (nunca menos de 100 células)
- Distribución heterogénea
- Errores humanos (contar mal o perder la cuenta, hacer mal los cálculos, mala visualización, no usar criterios homogéneos, subjetividades, errores de dilución)

# Galería Imágenes

## DISTRIBUCION UNIFORME



# Cámaras de recuento

## Cuidados de la cámara

- Inmediatamente después de usar es muy importante limpiar la cámara.
- Primero se limpia con etanol 70%
- Se limpia con agua (sólo si es muy necesario un poquito de detergente)
- Se seca con un papel suave (sin frotar) – o con Acetona

# Tinción Vital – Azul metileno



Limitaciones de la técnica:

## Tiempos de contacto con el colorante

Se requiere de tiempo para que entre el colorante y este sea modificado por las células vivas (3-5 min según la cepa)

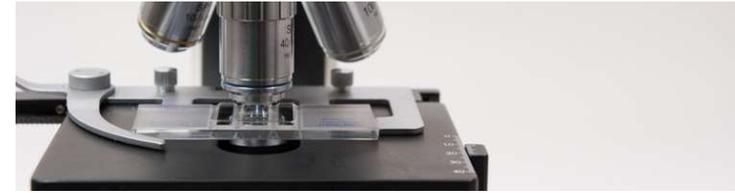
Exceso de tiempo (>10 min) puede matar a las células (oxidación).  
Tener cámara Neubauer lista y resto de los elementos antes de teñir.

# Recuento: práctico



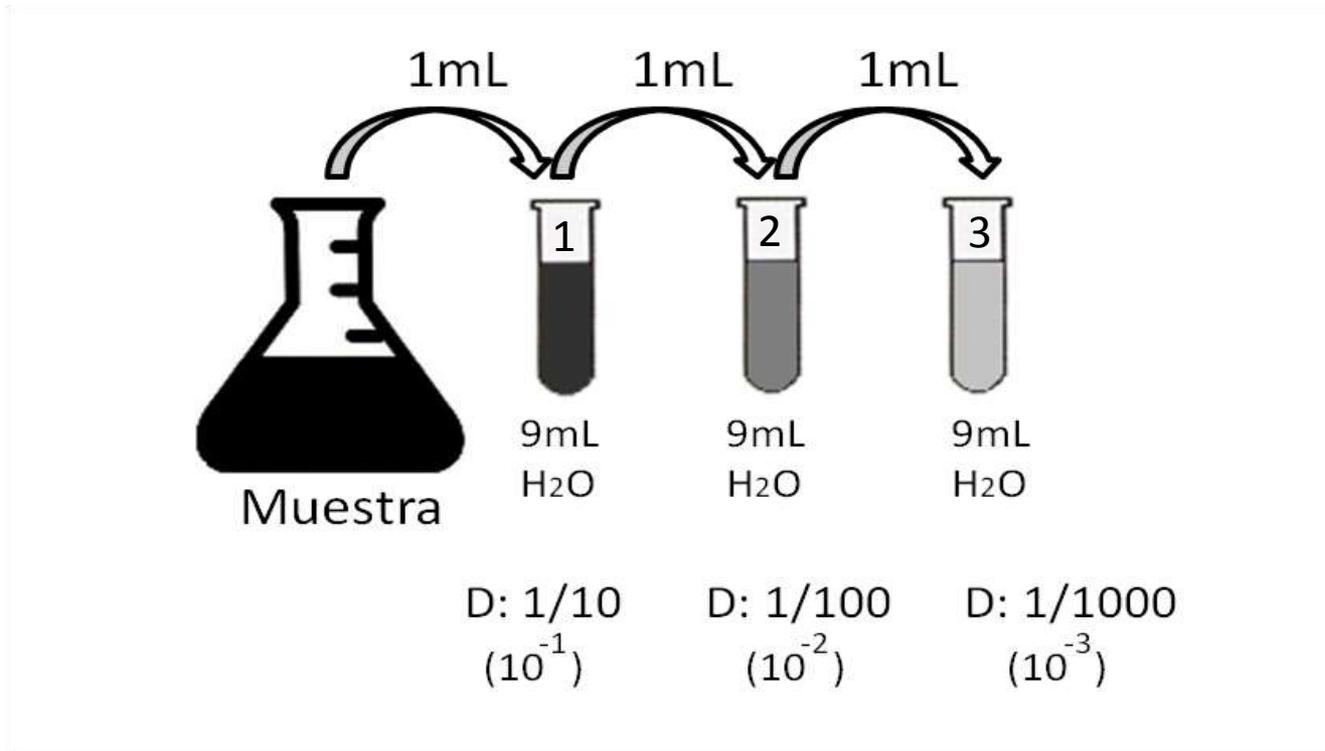
- Diluciones
- Cargar cámara
- Contar
- Realizar cálculos

# Recuento: diluciones



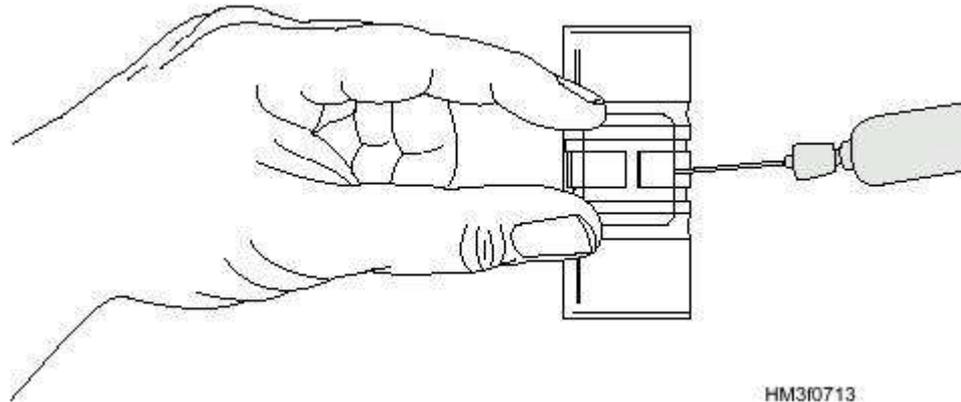
- Definir dilución a utilizar (Tabla 1)
- Definir el número de tubos a utilizar
- Llenar los tubos con 9 mL agua (pipetas 10 mL)
- Comenzar las diluciones (pipetas 1 mL):

# Recuento: diluciones



Ojo: Homogeneizar muy bien

# Recuento: carga de cámara



Usar capilar

¡A contar!

Ahora si: a contar y teñir!!!

INIBIOMA

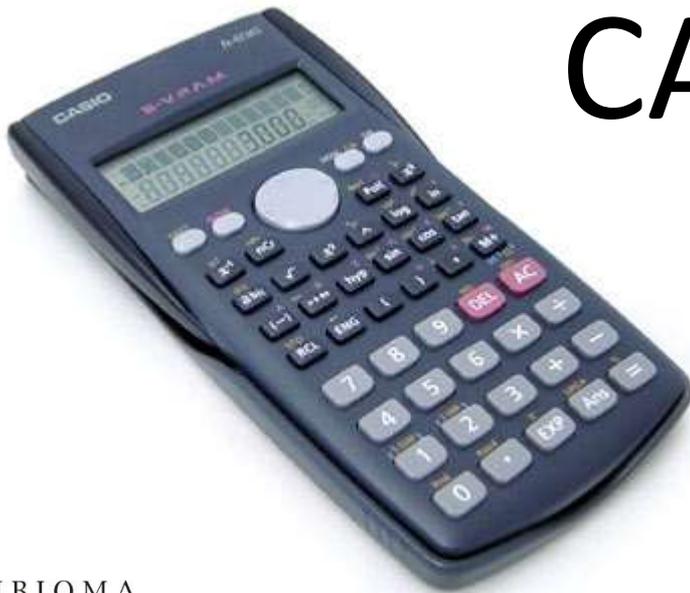


CONICET

U N C O



# CALCULOS



# CALCULO RECUENTO



**Células/mL = Células totales contadas x 50.000\* x factor de dilución**

Ejemplo: DILUCION 1/100 (dos diluciones seriadas de 1/10)

Recuento:

1) 67

2) 60

3) 62

4) 60

5) 51

TOTAL: 300

**Células/mL = 300 x 50.000 x 100 = 1.500.000.000 ó 1,5 billones cel/mL (= 1,5 x 10<sup>9</sup>)**

# Tinción Vital – Azul metileno



Cálculos:

$$\text{Viabilidad \%} = (\text{Cel. Totales} - \text{Cel. Muertas}) / \text{Cel. totales} \times 100$$

Recuento:

1) 65v + 2m

2) 58v + 2m

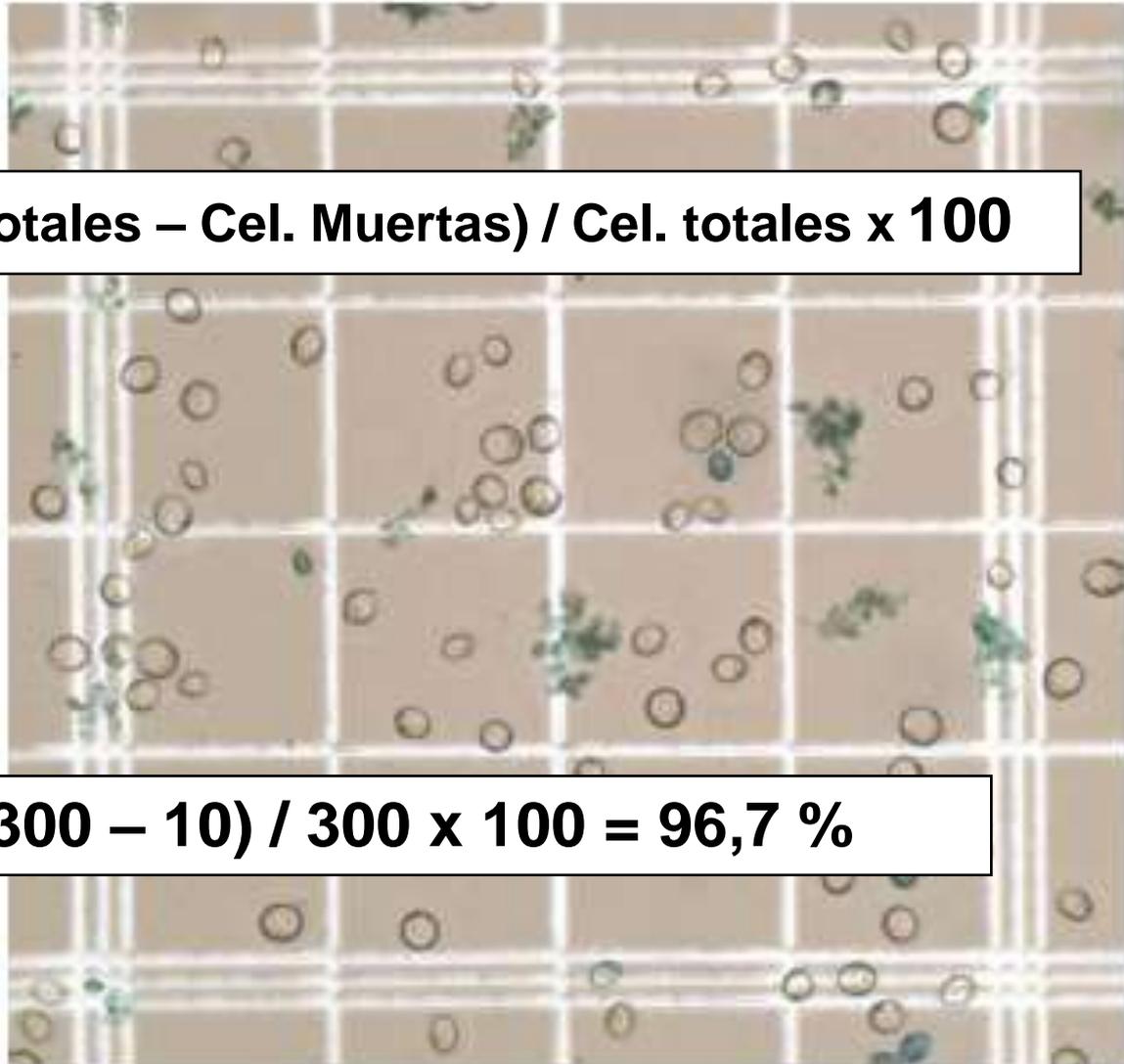
3) 60v + 2m

4) 58v + 2m

5) 49v + 2m

TOTAL: 290v + 10m

$$\text{Viabilidad \%} = (300 - 10) / 300 \times 100 = 96,7 \%$$



CALCULO INOCULO!!!

INIBIOMA



CONICET  

---

U N C O

# Ejemplos



**Ej. Cervecerero Comercial:** Cerveza Lager, T° 10°C, Lote 1.000L, 12°Plato/Brix (=1.048)

Células a inocular =  $1,5 \times 10^6$  cel/ml x  $1 \times 10^6$  mL mosto x 12° P/B=  $1,8 \times 10^{13}$

**\*Volumen crema a inocular (mL) =  $1,8 \times 10^{13}$  /  $1,5 \times 10^9$  Cel/mL = 1,2L crema**

Corrección por viabilidad **96,7%**: Implica 3,3% de células muertas  
=  $1,45 \times 10^9$  Células vivas/mL en crema.

Reemplazo en formula\* anterior: **Volumen crema a inocular (Corregido) = 1,24 L**

# Ejemplos



**Ej. Cervecerero Casero:** Cerveza Ale, T° Ferm. 18°C, Batch 50 L, 12 ° Plato (=1.048)

Células a inocular =  $0,75 \times 10^6$  cel/ml  $\times$   $5 \times 10^4$  ml mosto  $\times$  12 ° P/B =  $4,5 \times 10^{11}$

Células a inocular= 4.500.000.000.000 (=  $4,5 \times 10^{12}$ )

**\*Vol. crema a inocular (mL) =  $4,5 \times 10^{11}$  /  $1,5 \times 10^9$  Cel/mL = 300 mL crema**

Corrección por viabilidad 96,7%: Implica 3,3% de células muertas  
=  $1,45 \times 10^9$  Células vivas/mL en crema.

Reemplazo en formula\* anterior: **Volumen crema a inocular (Corregido) = 310 mL.**