

Tinción con azul de metileno

Alcance

El objetivo del método es proveer una estimación del porcentaje de células vivas presentes en una muestra de levaduras.

Principio

Las células vivas contienen enzimas capaces de reducir el azul de metileno a compuestos incoloros. Cuando las células están inmersas en azul de metileno, este penetra dentro de las células y las enzimas de las células vivas lo decoloran. Las células muertas, donde la enzima es inactiva, esto no ocurre y, por consiguiente, permanecen azul. El porcentaje de células no teñidas es entonces una mediada de la viabilidad.

Reactivos

Azul de metileno, citrato de sodio dihidratado y agua destilada. Disolver el azul de metileno (0.01g) en agua destilada (10ml). Agregar citrato de sodio dihidratado (2g) y agitar hasta disolución. Filtrar con papel de filtro y llevar el volumen filtrado a 100ml con agua destilada.

Equipos

Microscopio, cubreobjetos y portaobjetos.

Procedimiento

Mezclar la solución coloreada con igual volumen de una suspensión de la muestra de levaduras y colocar sobre un portaobjeto. La concentración de células debe ser de 40 – 60 células por campo del microscopio, usando un aumento de 600x.

Examinar aproximadamente 1000 células ignorando los brotes, excepto si su tamaño es mayor a un medio de la pared de la célula madre.

Expresión de resultados

Reportar viabilidad como el porcentaje de células no teñida.

Advertencias

Los métodos de tinción para la determinación de viabilidad son menos confiables que otros métodos, tal como el método de recuento por superficie que cuenta la proporción de células que han producido células hijas. Es importante recordar que el método del azul de metileno mide la presencia de enzimas específicas, estas enzimas pueden estar presentes en células incapaces de reproducirse o pueden no reaccionar con el azul de metileno en células viables.

La experiencia ha demostrado que la confiabilidad del procedimiento con azul de metileno disminuye cuando la muestra de levaduras comienza a perder viabilidad. De esta manera, aún cuando el método de tinción tiene la ventaja de ser rápido, solo proporciona un indicio de la viabilidad más que un valor absoluto. Si los resultados son dudosos, debe utilizarse el método de recuento por superficie.

REFERENCIAS

1. EBC Yeast Group, *Journal of the Institute of Brewing*, 1962, 68, 14.
2. Rocken, W., and Staruss, M., *Monatsschrift fur Brauerei*, 1976, 5, 209.