

CÁMARA THOMA Y NEUBAUER IMPROVED PARA EL RECuento DE LEVADURAS (TIRAJE)

En este documento se pretende explicar de forma clara y sencilla el proceso de recuento y viabilidad de las levaduras para el tiraje así como el uso de las fórmulas correspondientes en cada caso. Es un proceso sencillo pero requiere de una determinada paciencia para no equivocarse y conseguir un buen resultado.



Fig. 1: Foto y esquema de una cámara Thoma

Cámara Thoma

Datos básicos:

Cuadro central (centro de la cruz, 400 cuadros pequeños): $1\text{mm}^2/400$ cuadros.

Cuadro mediano (formado por 25 cuadros pequeños): $0.25\text{ mm} \times 0.25\text{ mm}$

Cuadro pequeño: $0.05\text{ mm} \times 0.05\text{ mm} = 0.0025\text{ mm}^2$

Líneas separadoras de cuadros medianos (en rojo): 0.025 mm del extremo del cuadro pequeño

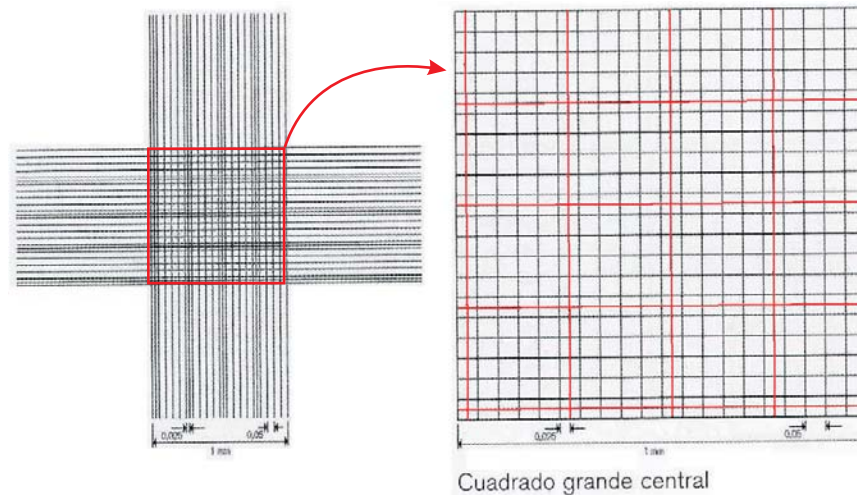


Fig. 2: Cámara Thoma

Cámara Neubauer improved:

Datos básicos (mismas medidas que las anteriores excepto cuadro mediano):

Cuadro grande central (formado por 400 cuadros pequeños): $1\text{mm}^2/400$ cuadros.

Cuadro mediano (formado por 16 cuadros pequeños): $0.2\text{ mm} \times 0.2\text{ mm}$

Cuadro pequeño: $0.05\text{ mm} \times 0.05\text{ mm} = 0.0025\text{ mm}^2$

Líneas separadoras: 0.025 mm

La diferencia entre la cámara Thoma y la cámara Neubauer reside en los cuadros laterales marcados con una “L”. Éstos sirven para recuento de otros microorganismos celulares. Para el caso del tiraje, no existe diferencia alguna porque se utiliza el cuadro central.

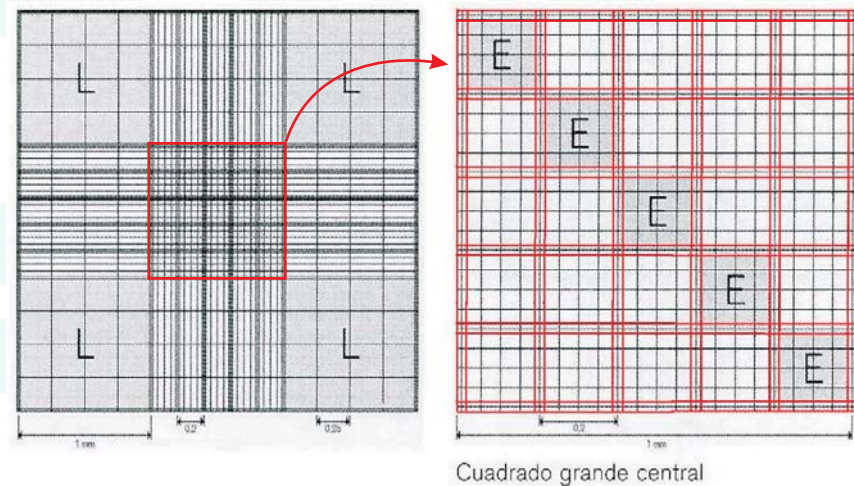


Fig. 3: Cámara Neubauer improved

Como utilizar las cámaras?

Preparación de la muestra:

- 1- Lavar la cámara y el cubre con agua destilada y alcohol 96%
- 2- Secar bien con papel suave.
- 3- Poner el cubreobjetos encima de la cámara
- 4- Homogeneizar removiendo bien el cultivo en donde residen las levaduras
- 5- Tomar con pipeta una muestra
- 6- Poner la punta de la pipeta en una de las dos ranuras de la cámara y, por capilaridad, las levaduras se distribuirán en la cámara
- 7- Si se crea una cámara de aire repetir la operación desde el principio.
- 8- Fijar la cámara de recuento en la platina del microscopio para realizar la observación microscópica
- 9- Esperar unos minutos antes de contar para que las levaduras se depositen en la cámara

Preparativos del microscopio:

El enfoque del microscopio se empieza con el objetivo de menor aumento que posteriormente pasaremos a uno de más. Se centra el objetivo del microscopio a ojo en el centro teórico de la cruz de la cámara, luego se coloca el objetivo lo más cerca posible del cubreobjetos pero sin tocarlo y posteriormente se irá alejándolo hasta que la imagen sea lo más clara y nítida posible. Se aconseja trabajar a 400 aumentos.

Contabilizar levaduras totales (recuento):

Se aconseja siempre hacer la media de levaduras contenidas en varios grupos de cuadros. Sea cual fuese el modelo de cámara empleado, el procedimiento es el mismo. Por ejemplo según la fig. 4, se presenta contabilizar las levaduras contenidas en los grupos de 25 y 16 cuadros respectivamente según la cámara usada.

Ej (cámara Thoma, grupos de 25 cuadros):

grupo I (G1) de 25 cuadros --> 14 levaduras

grupo 2 (G2) de 25 cuadros --> 15 levaduras
 grupo 3 (G3) " --> 13 "
 grupo 4 (G4) " --> 14 "

Media $14+15+13+14 / 4 = 14$ levaduras en 25 cuadros.

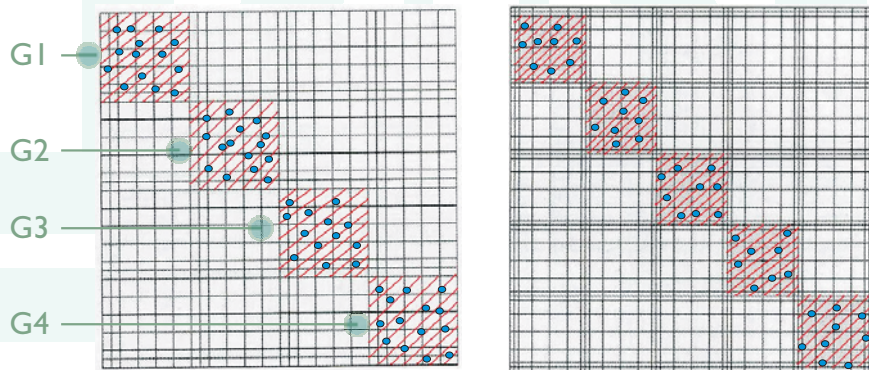


Fig. 4: Ejemplo de recuento por grupos en cámara Thoma y Neubauer improved

Y aplicar la fórmula genérica siguiente:

$$\frac{X \text{ levaduras}}{Y \text{ cuadros}} \times \frac{\# \text{ cuadros cámara}}{\text{Volumen cámara}} \times \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ cm}^3 (\text{o } 1 \text{ mL})} = x \text{ millones de levaduras / mL}$$

Tanto una cámara como otra tienen 400 cuadros útiles.

Volumen de la cámara Thoma = $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3$ (largo x ancho x profundo)

Volumen útil de la cámara Neubauer improved = $0,2 \text{ mm} \times 0,2 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm} \times 25 = 0,1 \text{ mm}^3$

Es decir, tanto si se usa la cámara Thoma como la Neubauer improved, para ambas, se utiliza la misma fórmula en donde las variables a utilizar serán el número de levaduras contenidas en tantos cuadros:

Ej:

Si se encuentran 14 levaduras en 25 cuadros en la cámara Thoma, los cálculos serían como prosiguen:

$$\frac{14 \text{ levaduras}}{25 \text{ cuadros}} \times \frac{400 \text{ cuadros}}{0,1 \text{ mm}^3} \times \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ cm}^3 (\text{o } 1 \text{ mL})} = 2.24 \text{ millones de levaduras / mL}$$

Utilizando una cámara Neubauer improved, para comprobar que no hay diferencias convertiremos las 14 levaduras en 25 cuadros a X levaduras en 16 cuadros aplicando una regla de tres:

14 — 25 Si existen 14 levaduras en 25 cuadros, ¿cuántas levaduras habrá en 16 cuadros?
 X — 16

$$X = 16 * 14 / 25 = 224 / 25 = 8,96$$

Por lo que en la cámara Neubauer improved habrá:

$$\frac{8,96 \text{ levadur.}}{16 \text{ cuadros}} \times \frac{400 \text{ cuadros}}{0,1 \text{ mm}^3} \times \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ cm}^3 (\text{o } 1 \text{ mL})} = 2.24 \text{ millones de levaduras / mL}$$

Se comprueba que ambas cámaras funcionan igual.

Existe un truco para ahorrarse tantos cálculos. Es más rápido pero que a su vez introduciría un poco más de error. Se trata de hacer grupos de 4 cuadros pequeños, formando una diagonal y hacer la media aritmética como hasta ahora se ha explicado. Una vez obtenida la media se multiplica por un millón y se obtienen los millones de levaduras contenidas por mL. Es decir:

$$\mathbf{X \text{ levaduras contenidas en 4 cuadros} \times 1.000.000 = \mathbf{X \text{ millones de levaduras / mL}}$$

Ej:

Según fig. 5 Si tenemos 3 grupos de 4 cuadros pequeños con 7 levaduras de media:

$$7+6+8 = 21 / 3 = 7$$

El resultado final sería **7** levaduras contenidas en 4 cuadros $\times 1.000.000 = 7$ millones de levaduras / mL

Si se han encontrado tantas levaduras contenidas en tantos cuadros, no se puede utilizar la fórmula rápida por lo que antes deberemos transformarlo con otra regla de tres:

Ej.:

Si se han encontrado 14 levaduras contenidas en 25 cuadros, ¿cuántas levaduras habrá en 4 cuadros? Hay que aplicar la siguiente regla de tres:

$$\begin{array}{l} 14 \text{ — } 25 \\ X \text{ — } 4 \end{array} \quad X = 4 \times 14 / 25 = 56/25 = 2,24$$

Aplicando la fórmula rápida:

$$\begin{aligned} 2,24 \times 1.000.000 &= 2.240.000 \text{ levaduras / mL} \quad \text{ó} \\ &= 2,24 \text{ millones de levaduras / mL} \end{aligned}$$

Se obtiene el mismo resultado que apareció aplicando la fórmula genérica.

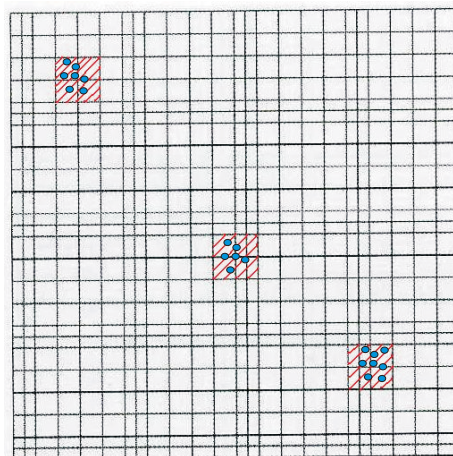


Fig. 5: Ejemplo de contaje por grupos de 4 en cámara Thoma o Neubauer improved

Contabilizar levaduras viables (% levaduras viables):

- 1- Mezclar una gota pequeña de colorante con una gota pequeña de mosto en fermentación en el portaobjetos normal.
- 2- Se tapa con un cubre
- 3- Se visualiza en un microscopio
- 4- Las levaduras teñidas están muertas y los no teñidas están vivas.
- 5- Se visualizan 3 campos en la diagonal del cubre como muestra la fig. 6. Se cuentan todas las levaduras contenidas en cada campo y se hace una lista de vivas y muertas y a partir de aquí se calcula el porcentaje de viables.
- 6- Para el calculo del % de viables se cuentan las vivas respecto el total

Nota I: El colorante puede ser cualquiera conocido. Si se usa el azul de metileno hay que tener en cuenta que se hace más difícil el contaje porque mancha mucho de azul la solución por lo que habrá que diluirlo antes de mezclarlo con la muestra a analizar o bien utilizar rodamina. Ésta tiene un color rosado suave por lo que hace más simple el recuento. Ambos colorantes pintan las levaduras muertas.

Ej:

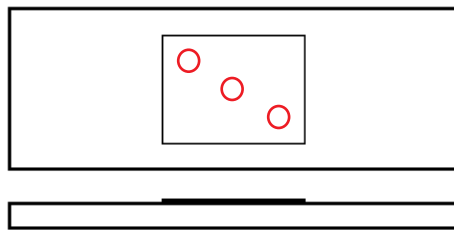


Fig. 6: Portaobjetos y cubreobjetos normal

Vivas	Muertas
15	2
20	0
10	1
45	3

$$\frac{45}{45 + 3} = \frac{45}{48} = 0,93 \longrightarrow \text{El 93\% son viables}$$