

Wie viele Hefezellen befinden sich in einem Gramm Bäckerhefe?

Methode:

In diesem Experiment wird durch eine Verdünnungsreihe die Anzahl der Hefezellen ermittelt, die sich in einem Gramm Bäckerhefe befinden. Hierfür werden die Hefezellen aus den hergestellten Verdünnungen auf einem Nährmedium ausgestrichen. Aus jeder einzelnen Hefezelle wächst eine „Zellkolonie“ heran, die mit dem bloßen Auge sichtbar ist. Alle Zellen in einer Kolonie sind erbgleich und können daher als Klone bezeichnet werden. Durch das Zählen der entstandenen Hefekolonien lässt sich die Anzahl der in einem Gramm Bäckerhefe befindlichen Zellen errechnen.

Materialien:

50-mL-Becherglas mit Uhrglas (Spiritus abdecken), Autoklav oder Schnellkochtopf, Brenner, Drigalski-Spatel, 200- und 300-mL-Erlenmeyerkolben, Filzstift, 10-mL-Messzylinder, Petrischalen (Ø = 90 mm), kurze Reagenzgläser oder Zentrifugengläser (h = 100 mm), Reagenzglasständer, Trockenschrank, Pasteurpipetten mit Gummihütchen, Waage.

Demineralisiertes Wasser, Malzextrakt-Agar (Fluka 70145), Desinfektionsmittel oder Isopropanol (70 Vol.%), Alufolie, Spiritus.

Frische Bäckerhefe.

Vom Lehrer vorbereitendes Material: (8 Gruppen)

Vorbereiten:

- (1) 4x: 100 mL Leitungswasser in 200-mL-Erlenmeyerkolben, mit Alufolie verschließen.
- (2) 1 L Malzextrakt-Agar nach den Angaben des Herstellers
- (3) 8x: Gummihütchen einzeln in Alufolie einwickeln
- (4) 8x: Pasteurpipetten einzeln in Alufolie einwickeln
- (5) 8x: 8 kurze Reagenzgläser (RG) mit Alukappe verschließen

Sterilisieren:

- (1) bis (3) im Schnellkochtopf (115 °C, 30 min) oder im Dampfdrucktopf = Autoklav (121 °C, 20 min).
- (4) und (5) im Trockenschrank (180 °C, 30 min).

Weitere Arbeiten:

- (6) 8x: Mit sterilisiertem Malzextrakt-Agar 5 Platten gießen.

Durchführung: Steril arbeiten!

1. Arbeitsplatz und Hände desinfizieren
2. 5 Petrischalen-Unterseiten beschriften, siehe Skizze:

$$\frac{1}{1000} \quad / \text{Datum} / \text{Namenskürzel}$$

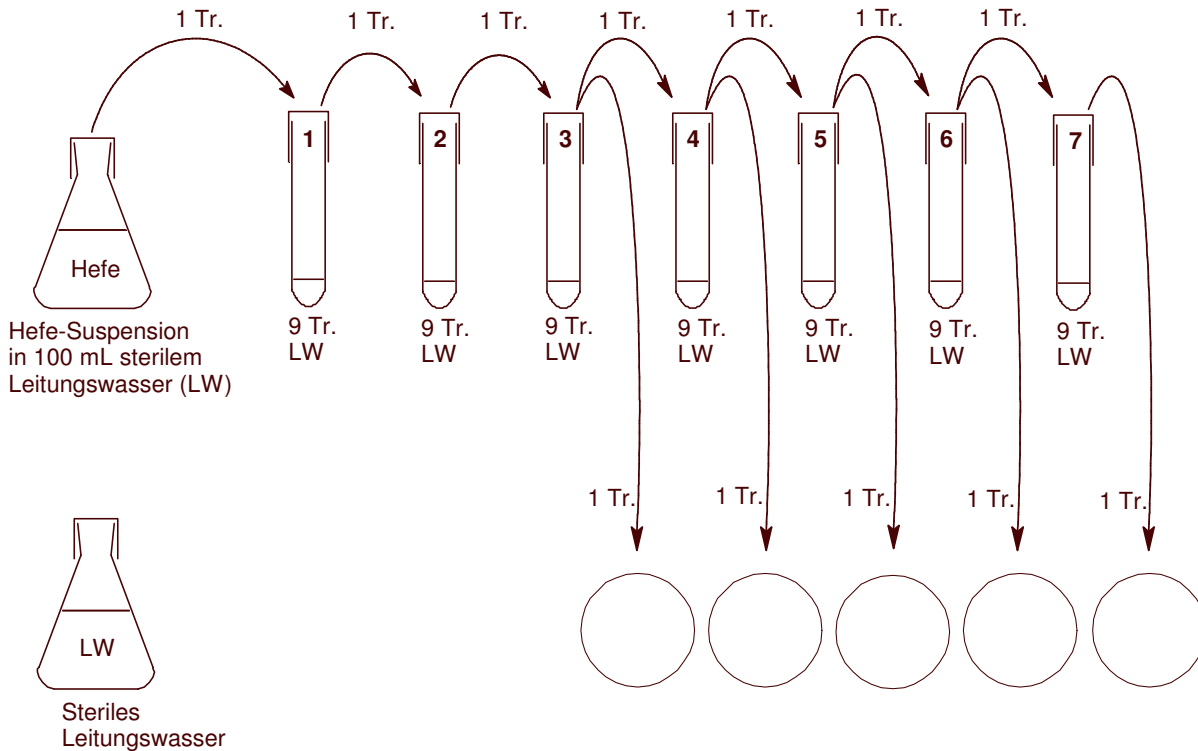
$$\frac{1}{10.000.000} \quad / \text{Datum} / \text{Namenskürzel}$$

3. Je 2 Gruppen stellen eine Hefesuspension her:

$\frac{1}{64}$ Hefewürfel (mit einem Faden aufgeteilt) auf Papier abwiegen (Masse der Hefe protokollieren!), mit sterilem Glasstab (in Spiritus tauchen und abflammen) in Erlenmeyerkolben mit 100 mL sterilem Leitungswasser überführen und kräftig rühren bis eine gleichmäßige Suspension entsteht.

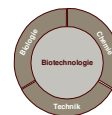
4. Lehrer: Verdünnungsreihe vorbesprechen und gesamten Arbeitsablauf demonstrieren, (Umgang mit Pasteurpipette, Pipettieren unter sterilen Bedingungen, Abflammen von Glasrand und Alukappe, Verdünnungsreihe erstellen, Ausplattieren mit dem Drigalskispatel).

5. Verdünnungsreihe erstellen und mit den Verdünnungsstufen $\frac{1}{1000}$ bis $\frac{1}{10.000.000}$ Plattenkulturen anlegen (siehe Skizze):



Verdünnung: $\frac{1}{1000}$ $\frac{1}{10.000.000}$

6. Mit der sterilen Pasteurpipette werden jeweils 9 Tropfen des sterilen Leitungswassers in die Reagenzgläser 1-7 übertragen.
7. Mit derselben Pasteurpipette werden alle Pipettierarbeiten mit der Hefesuspension durchgeführt:
 - Ein Tropfen aufgeschüttelte Hefesuspension in RG 1 übertragen.
 - Inhalt von RG 1 gut mischen und davon 1 Tropfen auf RG 2 übertragen.
 - Inhalt von RG 2 gut mischen und davon 1 Tropfen auf RG 3 übertragen.
 - Inhalt von RG 3 gut mischen und davon je 1 Tropfen auf RG 4 und auf die Agarplatte ($\frac{1}{1000}$) übertragen.
 - Inhalt von RG 4 gut mischen, (siehe Skizze).
8. Die Flüssigkeitstropfen aller Agarplatten jeweils mit einem zuvor in Spiritus getauchten, dann abgeflamten und wieder abgekühlten Drigalskispatel gleichmäßig verteilen.
9. **Tropfenvolumen der benutzten Pasteurpipette bestimmen:**
 In den 10-mL-Messzylinder wird mit der benutzten Pasteurpipette so viel Leitungswasser getropft (Tropfen zählen!) bis die 2-mL-Marke erreicht ist.
 → *Tropfenvolumen berechnen!*
10. **Agarplatten bebrüten:** Nach dem Einziehen der ausgestrichenen Flüssigkeit in den Agar werden die umgedrehten Platten (Deckel unten) im Trockenschrank bei 30 °C etwa 24 Stunden lang bebrütet.
11. **Auswertung:** Die Zellkolonien werden ausgezählt und die Zellzahl von einem Gramm Bäckerhefe berechnet.



Ergänzende Hinweise:

Zu 3.: Die Bäckerhefe soll möglichst frisch sein. Mithilfe eines Fadens wird der Hefewürfel halbiert, geviertelt, geachtelt, usw. bis $\frac{1}{64}$ -Stücke für die Hefe-Suspensionen vorliegen.

Zu 4.: Je nach Alter und Vorbildung der Schüler/innen ist es evtl. sinnvoll, für die einzelnen Arbeitsschritte eine Übungsphase (z.B. mit Leitungswasser) einzubauen. Selbst das Übertragen von einzelnen, möglichst gleich großen Flüssigkeitstropfen mithilfe der Pasteurpipette macht bisweilen Schwierigkeiten. Zum Beispiel wird mit der Pasteurpipette zu viel Flüssigkeit aufgenommen.
Weisen Sie die Schüler/innen in das sterile Arbeiten ein.

Zu 5.: Die Reagenzgläser können mit Alu-Folie verschlossen werden. Stabile Alu-Kappen erleichtern aber das Arbeiten (Öffnen und Schließen der Reagenzgläser).

Der Lehrer könnte einer Gruppe drei weitere Petrischalen zur Verfügung stellen für:

- Ausstrich von einem Tropfen sterilen Leitungswassers (Kontrolle).
- Ausstrich von je einem Tropfen der verdünnten Hefesuspensionen (1:10, 1:100).

Zu 10.: Sie können die Agarplatten auch mehrere Tage lang bei Raumtemperatur inkubieren. Bewahren Sie anschließend die Platten mit den gewachsenen Hefekolonien bis zur Auswertung im Kühlschrank auf.

Zu 11.: Wie viele Hefezellen befinden sich in einem Gramm Bäckerhefe?
Zur Auswertung eignet sich die bebrütete Agarplatte mit 50 bis 200 Hefezellkolonien.

Beispiel:

Anzahl Zellkolonien: 89

Verdünnungsstufe der ausplattierten Hefezellsuspension: $\frac{1}{100.000}$

Ursprüngliches Volumen der Hefezellsuspension: 100 mL

Tropfenvolumen der verwendeten Pasteurpipette: 0,029 mL

Masse der eingesetzten Hefeportion: 0,75 g

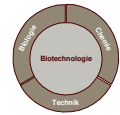
$$\text{Hefezellzahl} = \frac{89 \text{ Zellen} \cdot 100.000 \cdot 100 \text{ mL}}{0,029 \text{ mL} \cdot 0,75 \text{ g}} = 4,09 \cdot 10^{10} \frac{\text{Zellen}}{\text{g}}$$

Zusatzfragen:

- Warum haben wir verschiedene Verdünnungen der Hefesuspension ausplattiert?
⇒ Würde man nur eine Verdünnung ausplattieren, wäre das Ergebnis nicht sehr aussagekräftig. Erst der Vergleich mit verschiedenen Verdünnungen zeigt, ob mit jeder weiteren Verdünnungsstufe auch die Anzahl der Zellkolonien abnimmt. Außerdem kann ein dichter Zellrasen nicht ausgezählt werden. Wachsen sehr wenige Kolonien auf der Agarplatte, ist die Fehlerquote sehr hoch.
- Welche Hefezellen werden mit dieser Zählmethode erfasst?
⇒ Nur lebende Hefezellen, die sich vermehren können, werden durch diesen Versuch erfasst.

Entsorgung:

Da es sich um normale Bäckerhefe handelt, kann das Verbrauchsmaterial mit dem normalen Abfall entsorgt werden.



Schülerprotokoll (Klasse 10):

Wie viele Hefezellen befinden sich in 1 g Bäckerhefe?

05.11.03

Christine K.

Methode:

$\frac{1}{64}$ eines Hefewürfels wird gewogen und in 100 mL sterilem Leitungswasser suspendiert.

Ein Tropfen dieser Suspension wird jeweils um Faktor 10 mit sterilem Leitungswasser verdünnt. Die Verdünnungsstufen 10^{-3} bis 10^{-7} werden mithilfe eines Drigalski-Spatels auf Malzagarplatten ausplattiert und bei 30 °C ca. 24 Stunden lang bebrütet. Die Agarplatte mit 50 bis 200 Hefezellkolonien wird ausgewertet.

Ergebnisse:

Tropfenvolumen der benutzten Pipette: 0,042 mL

Masse der untersuchten Hefe: 0,746 g

Ein Tropfen der Verdünnungsstufe 10^{-5} enthält 52 Hefezellen

Auswertung:

0,746 g Hefe sind in 100 mL sterilem Leitungswasser suspendiert

$7,46 \cdot 10^{-3}$ g Hefe sind in 1 mL Wasser enthalten

$3,1332 \cdot 10^{-4}$ g Hefe sind in 0,042 mL (1 Tropfen) enthalten

Dieser Tropfen Suspension mit $3,1332 \cdot 10^{-4}$ g Hefe wird in ein Reagenzglas mit 9 Tropfen Wasser gegeben. Dort verteilt sie sich nun gleichmäßig auf die 10 Tropfen Wasser, sodass 1 Tropfen der neuen Suspension $1/10$ soviel Hefezellen enthält wie der ursprüngliche Tropfen:

Bei der Verdünnung von 10^{-1} enthält je ein Tropfen $3,1332 \cdot 10^{-5}$ g Hefe

Bei der Verdünnung von 10^{-2} enthält je ein Tropfen $3,1332 \cdot 10^{-6}$ g Hefe

Bei der Verdünnung von 10^{-3} enthält je ein Tropfen $3,1332 \cdot 10^{-7}$ g Hefe

Bei der Verdünnung von 10^{-4} enthält je ein Tropfen $3,1332 \cdot 10^{-8}$ g Hefe

Bei der Verdünnung von 10^{-5} enthält je ein Tropfen $3,1332 \cdot 10^{-9}$ g Hefe

Daraus folgt, dass in $3,1332 \cdot 10^{-9}$ g Hefe 52 Hefezellen enthalten sind.

Also enthalten 1g Hefe $1.659645091 \cdot 10^{10}$ Hefezellen.

Ergebnis:

In 1 g frischer Bäckerhefe befinden sich 16,6 Milliarden lebende Hefezellen.

Literatur:

H. Bayrhuber, E. R. Lucius (Hrsg.): Handbuch d. praktischen Mikrobiologie u. Biotechnik, Bd.1, Metzler 1992
A. Messerschmitt, K. Ballmer-Hofer, G. Hess: Praktikum im Schullabor, Novartis Basel, 2001