



Lichtmikroskopische Untersuchungen an Hefepilzen

**BrauLabor 5
Gesamtzellzahl:**

**Mikroskopische
Zellzählung in
Zählkammer**

Aufwand: mittel	Material: mittel	Zeit: mittel	Experimenttyp: Untersuchung/Beobachtungen	Anspruch: einfach
---------------------------	----------------------------	------------------------	---	-----------------------------

Einführung

Die Zahl der Hefezellen pro Flüssigkeitsvolumen (= Konzentration, z.B. n/mL) ist zur Bestimmung der Anstellhefekonzentration (\rightarrow korrekte Hefegabe/Hefedosage, engl. pitching rate) von grosser Bedeutung: eine falsche Anstellkonzentration - vor allem eine zu geringe - kann zu einer erhöhten Ester- und Fuselbildung führen. Hierdurch wird der Geschmack des Bieres verschlechtert und die Wahrscheinlichkeit eines „Katers“ steigt.



Kennen lernen der

- Häemocytometer-Methode (Zählkammer nach Thoma) zur Bestimmung der Gesamtzellzahl bzw. der Zellkonzentration (Anzahl Hefezellen/Volumen)
- Berechnung der Anstellkonzentration (engl. Pitch rate)

Materialien

Glaswaren/Geräte/ andere Materialien	Lichtmikroskop inkl. Zubehör, Präpariernadel/ Lanzettadel, Pinzette, Glasstab Zählkammer nach Neubauer oder Thoma (Info: Ausrüstung komplett), Bsp. Marienfeld Neubauer improved: Tiefe 0.100 mm, 0.0025 mm ² (Info)
Verbrauchsmaterial	Wasser, Linsoft (Kosmetiktüchlein), Objektträger (OT), Deckgläser (DG), Pasteurpipetten, wasserfeste Faserschreiber, evtl. Linsenreinigungstüchlein, Methyleneblau oder Methyleneblaulösung: cf. Braulabor 4
Chemikalien	Verdünnungsmedium (z.B. Wasser, Nährlösung, physiologische Kochsalzlösung NaCl 0.9%)
Biologische Objekte	Brauhefen in Suspension, z.B. Anzuchtmedium, Aufbewahrungsmedium von vorhergehendem Ansatz

Lichtmikroskopische Untersuchung: Bestimmung der Gesamt-Hefezellzahl in einer Zählkammer

Ein weit verbreitetes Verfahren zur Bestimmung der Gesamtzellzahl (lebende vitale, aber auch tote Zellen erfassend - ausser im gefärbten Zustand mit Methyleneblau \rightarrow cf. Braulabor 4) bei relativ hoher Zellkonzentration ($> 10^7$ Zellen/mL) wie flüssige Anzuchtkulturen ist die direkte mikroskopische Auszählung der in dünner Flüssigkeitsschicht in einer sog. [Zählkammer](#) verteilten Zellen. Dabei muss aber strikte auf mögliche Fehlerquellen geachtet werden: 1. Schwankungen der tatsächlichen Dicke der Flüssigkeitsschicht in der gefüllten Zählkammer /Kapillarkräfte zwischen Zählkammerboden und Deckglasoberfläche, 2. Adsorption von Mikroorganismen an Glasoberflächen an Glasoberflächen - bei den "grossen" Hefen im Vergleich zu Bakterien allerdings vernachlässigbar).



Abb. 1. Zählkammer Neubauer-improved.

Zählkammer mit Deckglas. [Info](#) > Anleitungen Zählkammern.

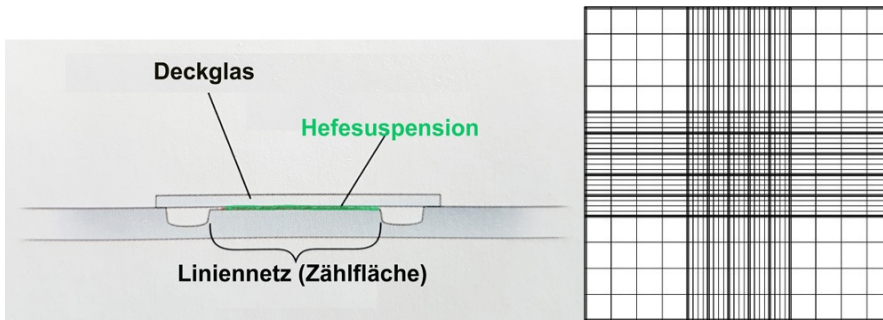


Abb. 2. Zählkammer nach Neubauer improved.

Links: Längsschnitt durch Zählkammer. Die Kammertiefe beträgt 0.100 mm (100 μm).

Rechts: Zählgitter bzw. Zählnetz. Insgesamt hat es $3 \times 3 = 9$ Grossquadrate (Länge L pro Grossquadrat = 1 mm, Fläche $F = 1 \text{ mm}^2$), das zentrale Auszählquadrat bestehend aus $5 \times 5 = 25$ Kleinquadraten (= sog. Gruppenquadrate: L pro Kleinquadrat = 0.2 mm, $F = 0.04 \text{ mm}^2$, Kammertiefe = 0.1 mm, Volumen = $4 \cdot 10^{-6} \text{ mL}$, Umrechnungsfaktor für Zellzahl/mL = 2.5×10^5) à je $4 \times 4 = 16$ Kleinstquadrate (= Zählquadrate: L = 0.05 mm, $F = 0.0025 \text{ mm}^2$, Kammertiefe 0.1 mm, Volumen = $2.5 \times 10^{-7} \text{ mL}$).

[Info.](#) [Info umfassend.](#)

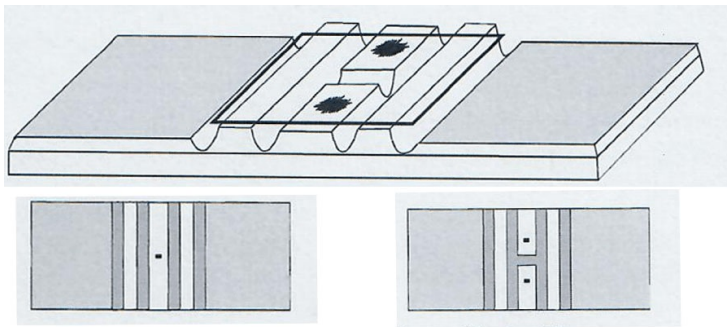


Abb. 3. Zählkammern weisen Vertiefungen (Längsnuten) und Zählnetze auf. Je nach Ausführung - einfach (Mittelsteg ungeteilt: links unten) oder doppelt (Mittelsteg geteilt: rechts unten) weisen sie ein oder zwei Zählnetze auf.

[Quelle Abb.: [Marienfeld](#)]

Vorgehen: Gesamtzellzahlbestimmung GZ oder

Gesamtzellzahlbestimmung lebender Zellen (Viabilitätzellzahl VZ)

- Vorbereitung der Hefeprobe:

Probemenge der zu untersuchenden absolut homogen gemischten und nicht zusammen geballten (ausgeflockten) Hefesuspension entnehmen (z.B. 1.0 mL) - die entnommene Probe muss repräsentativ für die zu untersuchende hefehaltige Flüssigkeit (z.B. Anzuchtkultur/ Anstellkultur/Startkultur/Propagations- oder Reinzuchthefer, beimpfte Anstellwürze, Erntehefe) sein!

Je nach Zelldichte (Zellanzahl/Volumen) mit einer geeigneten Flüssigkeit reproduzierbar verdünnen (cf. Materialien/Chemikalien); diese Verdünnung muss bei der Auswertung natürlich berücksichtigt werden!

VZ: Methylenblau im Verhältnis 1:1 dazu geben (cf. Braulabor 4 für Methylenblauinformationen, "Vorgehen Methylenblaufärbung für Hefen für einen Viabilitätstest")

- Vorbereitung der Zellzählung:

- 1: Verdünnung Hefeprobe: Hefesuspension entsprechend der Aufgabenstellung verdünnen (vgl. Abb. 4 → bei einer Zelldichte grösser oder gleich der gezeigten ist eine zusätzliche Verdünnung notwendig)
- 2: Anfärbung: pro 5 mL Hefesuspension 1 Tropfen Farbstammlösung zugeben (= ca. 0.05 mL)
- 3: Zählkammer vorbereiten: mit entionisiertem bzw. dest. Wasser Aussenstege befeuchten und Deckglas mit sanftem Druck von vorne auf die Zählkammer aufschieben (Abb. 5)
- 4: Zählkammer befüllen: mit einer Pasteurpipette (auch Glasstab) die homogenisierte Probe schnellst-möglich als kleinen Tropfen seitlich an

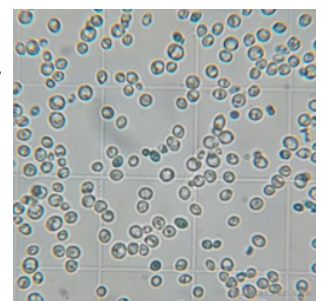


Abb. 4. Eine vitale Hefekultur in einer Zählkammer:

pro Kleinstquadrat des Liniennetzes hat es zu viele Hefezellen → Zusatzverdünnung notwendig.

[Quelle Bild: [Abb. 7](#)]

den Spalt Deckglas-Trägerplatte heran führen, damit sie durch Kapillarkräfte in die Zählkammer hinein gezogen wird (bei 2 Zählnetzen: von jeder Seite her ausführen)

- 5: Sedimentation Hefezellen: nach einer Wartezeit von ca. 2 min sind die Hefezellen sedimentiert und können nun ausgezählt werden



- **Auszählen der Neubauer-Kammer:**

- 1: Zählkammer ins Mikroskop bei der schwächsten Vergrößerung einspannen
- 2: bei weitgehend geschlossener Kondensorblende auf alle Zählquadrate fokussieren und scharf einstellen
- 3: auf die **optimale Vergrößerung 400x** scharf fokussieren
- 4: Hefezellzahl und Hefenverteilung bewerten:
Zellzahl: 50 - 100 Zellen pro zentralem Auszählquadrat im Mikroskop bei 400x.
Zellverteilung: Zellen sollten zufällig und regellos über das Zählnetz verteilt sein, keine Anhäufung an einer Seite oder in einer Ecke → andernfalls Zählkammer neu füllen!
- 5: von jedem der beiden Zählgitter der Kammer werden die fünf grünen Kleinquadrate (Nr. 1 - 5, grün markiert in Abb. 6) ausgezählt

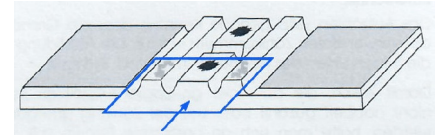


Abb. 5. Deckglas auf die angefeuchtete Zählkammer schieben.

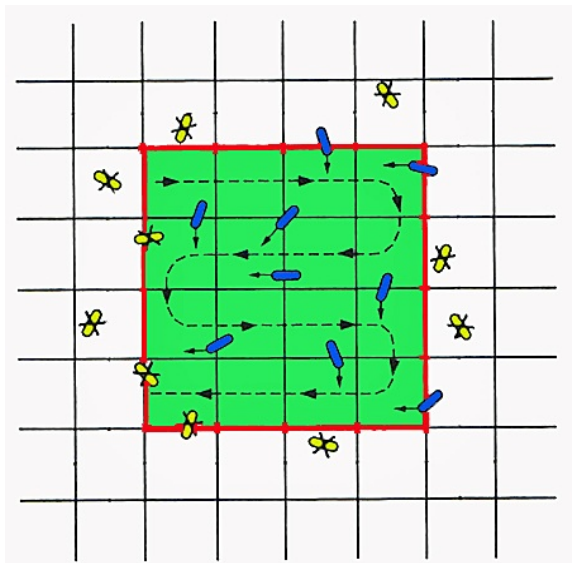


Abb. 7. Auszähltechnik. Die in den grünen Kleinquadraten ($F = 0.04 \text{ mm}^2$) liegenden 16 Kleinstquadrate werden von links oben beginnend der gestrichelten Linie - - - nach auf Hefezellen durchmustert. Die auf bzw. über der **oberen** und **rechten Begrenzungslinie** des **Kleinquadrats** liegenden Zellen werden **mitgezählt**, nicht aber die auf der unteren und linken Linie sowie die ausserhalb liegenden Zellen (Zellen durchgestrichen).

Hinweis: sind zu viele Zellen aneinander klebend (Sprossverband, Ketten oder Haufen), sollten sie getrennt werden: cf. Methoden zur Entflockung der Hefen (S. 4).

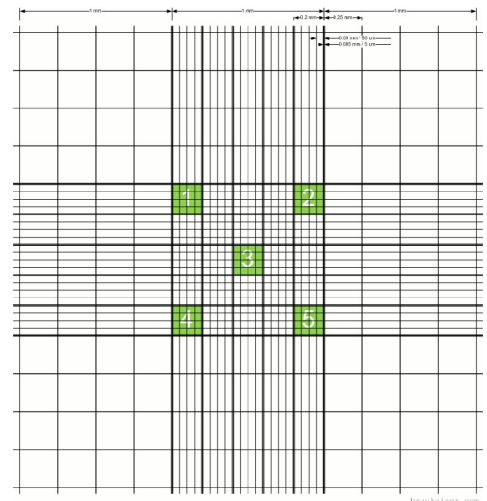


Abb. 6. Zählnetz mit zentralem Auszählquadrat mit 25 Kleinquadraten. Die 5 grün markierten Kleinquadrate (4 Eckquadrate [1,2,4,5], 1 Zentralquadrat [3]) mit je 4x4-Kleinstquadraten werden in der Regel ausgezählt [Quelle [Abb. 13](#)]

6: Wichtige Hinweise vor der Auswertung:

- es muss immer eine Doppelbestimmung durchgeführt werden (oberes Zählnetz und unteres Zählnetz!)
- die Differenz der gezählten Hefezellen in den 5 Kleinquadraten innerhalb der Grossquadrate der beiden ausgezählten Gitternetze darf nicht mehr als 10 Zellen betragen
- statistisch gesehen sollten mindestens 100 Zellen gezählt werden

Methoden zur Entflockung der Hefen



① Kräftiges Durchmischen

Zuallererst sollte die Hefeprobe kräftig geschüttelt werden:

- Reagenzglas mit der Hefeprobe zwischen den Handballen kräftig rotieren lassen
- Reagenzglas kräftig mit Zeig- und Ringfinger am unteren Drittel schlagen
- Reagenzglasschüttler (Vortexmischer): im Reagenzglas bei geeigneter Drehzahl zwischen 1000 - 2800 rpm aufwirbeln

② Frische Bierwürze (Anstellwürze)

Maltose verhindert die Flockung. Einfach frische Bierwürze zum Hefesediment geben und einige Minuten auf dem Magnetrührer durchmischen lassen. Verdünnungsfaktor durch Zugabe der Bierwürze berücksichtigen!

③ Schwefelsäurebehandlung

Zugabe von Schwefelsäure H_2SO_4 0.5% (Vorsicht: korrosiv, ätzend; [Infos](#)) entflockt die Hefen, ohne eine Färbung mit Methyleneblau zur Viabilitätsbestimmung zu behindern (1 mL Hefesuspension + 1 mL Methyleneblaulösung). Diese Schwefelsäure-behandelten Zellen sollten aber nicht mehr als Anstellhefe benutzt werden.

④ EDTA [Info](#)

Ethylendiamin-tetraessigsäure ist ein sog. Komplexbildner, der die bei der Flokkulation benötigten Calciumionen Ca^{2+} bindet. EDTA beeinträchtigt weder die Viabilität noch das Methyleneblau-Verfahren. Zum (optimal zentrifugierten) Hefesediment ohne Überstand im gleichen Volumenverhältnis Überstand : EDTA-Lösung eine 100 g/l, 0.268 M-EDTA-Lösung zufügen und durchmischen.

- Auswertung - Berechnung der Zellzahlen:

1: Kennzahlen Neubauer Zählkammer 0.1 mm (= 100 μm) Tiefe; Fläche **Kleinquadrat** = 0.2mm x 0.2mm = 0.04 mm²;
Volumen = 0.1 mm x 0.04 mm² = 0.004 mm³ = 0.004 μl $\rightarrow 2.5 \times 10^5 \times 0.004 \text{ mm}^3 = 1.00 \text{ mL}$

2: Formel Zelldichte = Zellzahl/mL unverdünnter Hefezellensuspension: cf. Kasten

GZ = Gesamtzellzahl/mL:

$$\frac{\text{Gesamtzahl der gezählten Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Volumenumrechnungsfaktor auf 1 mL}}{\text{Anzahl ausgezählter Kleinquadrate}}$$

$$\frac{\text{Gesamtzahl der gezählten Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 2.5 \cdot 10^5}{\text{Anzahl ausgezählter Kleinquadrate}}$$

Beispielsberechnungen:

Verdünnungsfaktor VF: Anzahl Probevolumen Verdünnungsflüssigkeit plus 1 (oder Gesamtvolumen [Probe + Verdünnung]/Probe)
keine Verdünnung: VF = 1

1 mL Probe + 1 mL Verdünnungsflüssigkeit: VF = 1 + 1 = 2 (oder $[1 + 1]/1 = 2$)

2 mL Probe + 10 mL Verdünnungsflüssigkeit: VF = 1 + 5 = 6 (oder $[2 + 10]/2 = 6$)

0.5 mL Probe + 3.5 mL Verdünnungsflüssigkeit: VF = 1 + 7 = 8 (oder $[0.5 + 3.5]/0.5 = 8$ [Info](#))

Zelldichte: 2 x 5 ausgezählte Kleinquadrate, Gesamtzahlen; 220 Zellen bzw. 208 Zellen, VF: 0.5 mL Probe, 11.7 mL Verdünnungsflüssigkeit \rightarrow VF = $[0.5 + 11.7]/0.5 = 24.4$

Zellzahl/mL = $(220 + 208) \times 24.4 \times 2.5 \cdot 10^5 / 10 = 261'080'000 = 261 \times 10^6 = 261 \text{ Millionen}$

Die Anstellichten bewegen sich je nach der Stammwürze zwischen 6 - 24 Mio. Zellen/mL (cf. z.B. [Info](#)).



Gesamtzellzahlbestimmung lebender Zellen (Viabilitätszellzahl VZ)

Nach der Behandlung mit Methylenblau, einer guten Durchmischung und einer 1 - 2-minütigen Ruhepause wird die Zählkammer wie oben beschrieben für die Gesamtzellzahl gefüllt und ausgezählt, wobei aber bei der VZ-Bestimmung zwischen den lebenden und toten Zellen gemäss folgendem Schlüssel differenziert und protokolliert wird:

- tote Zellen = dunkelblau gefärbt, von der Gesamtzellzahl GZ abziehen
- blass blau gefärbte Zellen und blau gefärbte knospende Tochterzellen mit nicht-gefärbter Mutterzelle sind lebend und werden nicht von der GZ abgezogen

Auswertung:

VZ = Viabilitätszellzahl in %:

$$\frac{[\text{Gesamtzahl der gezählten Zellen (lebend + tot)} - \text{Gesamtzahl toter Zellen}]}{\text{Gesamtzahl der gezählten Zellen (lebend + tot)}} \times 100$$

Beispielsberechnung:

Gesamtzahl toter Zellen: 17
Gesamtzahl lebender Zellen: 745

→ Viabilität [%] = $[(745 - 17)/745] \times 100 = 97.72\%$ Das Resultat ist > 85-90% → Ergebnis kann akzeptiert werden.

Reinigung von Zählkammern

- sofort nach durchgeführter Zellzahlbestimmung Deckglas abnehmen
- Zählkammer mit dest./ention. Wasser ausgespült
- bei hartnäckiger Verunreinigung mit einer milden Reinigungslösung reinigen; Alternative: über Nacht in 70%-Ethanol oder Aceton einlegen
- mit 70% 2-Propanol oder anderem ähnlichen Desinfektionsmittel reinigen
- anschliessend Zählkammer mit weichem Tuch ohne Fuselbildung abtrocknen oder mit Aceton abspülen.

