



Hefewachstum: Lebendzellzahlbestimmung durch Verdünnen der Hefesuspension und anschliessendem Wachstum zu von Auge sichtbaren Kolonien

**BrauLabor
11
Verdünnungs-
reihe
Bestimmung
der
Lebendzellzahl**

Aufwand: mittel-hoch	Material: hoch	Zeit: mittel	Experimenttyp: Koloniewachstum	Anspruch: mittel-hoch
--------------------------------	--------------------------	------------------------	--	---------------------------------

Einführung

Eine direkte wachstumsbasierte und damit genaue Bestimmung der Lebendzellzahl bei Hefen ("Keimzahlbestimmung*") ist bei Flüssigkulturen durch Auftragen unverdünnter Organismenproben auf Malzagarplatten nicht möglich. Die die Keimzahl ist bei unverdünnter Organismensuspension normalerweise so hoch, dass keine von blossem Auge zählbaren Einzelkolonien heranwachsen. Es würde sich ein zusammenhängender "Heferasen" bilden. Man verdünnt deshalb die organismenhaltige Flüssigkultur mit einer sterilen physiologischen Kochsalzlösung in mehreren 1:10er Stufen, um den Gehalt an vermehrungsfähigen Hefen zu reduzieren. Eine gute Durchmischung nach jedem Verdünnungsschritt ist zwingend, weil Hefen Zellklumpen bilden können, was eine grosse Fehlerquelle darstellen kann.

*: definierte Begriffe → siehe Info > Glossar Mikrobiologie



Kennen lernen einer etwas aufwändigen laborüblichen Methode der mikrobiellen Lebendzellzahlbestimmung* mittels Verdünnungsreihe* aus Ausplattieren.

Materialien

Glaswaren/Geräte/ andere Materialien	Gasbrenner, sterile Messpipetten (1 x 10 mL, 7 x 1 mL) inkl. Pipettierhilfen (z.B. Peleus-Ball [Info] oder Pipettierhilfen pi-pump [Info], 6 Reagenzgläser (RG, steril), RG-Ständer, Drigalksipatel, evtl. Kolbenpipettierhilfe für 1 mL-Messpipette, abdeckbares Gefäss (z.B. Becherglas 400 mL mit passender nicht brennbarer Abdeckung, z.B. Uhrglas, Petrischalendeckel, Glasplatte; ideal: Färbwanne mit Deckel [Info])
Verbrauchsmaterial	Zündhölzchen/ Gasanzünder, Einwegpetrischalen (oder autoklavierte Glaspetrischalen), wasserfester Filzstift
Chemikalien	16* Malzagarplatten [MA] (siehe Braulabor 7: Nährmedienrezepte für Hefen und Bakterien - Rezept M3), 0.9% NaCl steril, Ethanol (oder Isopropanol) 70% für Oberflächenentkeimung, Ethanol (Brennsprit) Hinweis: für eine erste grobe Abschätzung genügen auch nur 8 MA
Biologische Objekte	Brauhefen-Flüssigkultur (z.B. eingekaufte Hefeflüssigkultur [Wyeast, White Labs, Hefe-Anzuchtkultur aus Trockenhefe, Anstellhefe [Starterkultur] u.a.)

Wachstumsbasierte Methode der Hefezahlbestimmung: Verdünnen - Koloniewachstum - Auszählen & Hochrechnen

Durchführung

1. Verdünnungsreihe

1. Materialien bereit stellen: im Voraus sterile Materialien vorbereiten (Malzagarplatten, physiol. Kochsalzlösung) → siehe Materialien
2. Arbeitsplatz "Mikrobiologie-gerecht" einrichten: vgl. Website "Mikrobiologische Aspekte" > Minimaltechnik I sowie 2.5.1. Giessen von Nähragarplatten, Pkt. 1+2

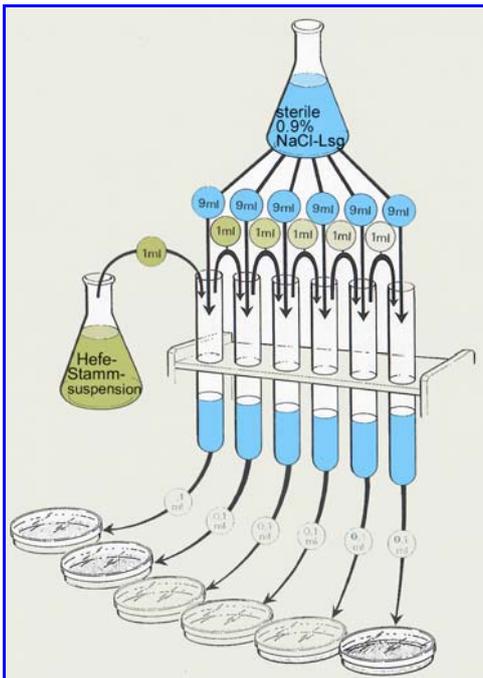


Abb. 1. Verdünnungsreihe: Pipettierschema.

Statt wie dargestellt kann man auch nur 4.5 mL NaCl-Lösung vorlegen und dann nur 0.5 mL der jeweiligen Organismensuspension überpipettieren.

3. 6 sterile RG mit Verdünnungsschritt beschriften:
 - 10^0 (1:10 Verdünnung)
 - 10^{-2} (1:100 Verdünnung)
 - 10^{-3} (1:1000 Verdünnung)
 - 10^{-4} (1:10'000 Verdünnung)
 - 10^{-5} (1:100'000 Verdünnung)
 - 10^{-6} (1:1'000'000 Verdünnung)
4. Unterseiten von je 2* der Malzagarplatten wie folgt beschriften:
 K (Kontrolle), 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}
*Hinweis: wenn man die ungefähr zu erwartende Hefezellzahl weiss, kann man die Anzahl der Verdünnungsstufen und damit der Malzagarplatten reduzieren! Man plattiert nur noch jene Verdünnungsstufen aus, die **Koloniezahlen (KBE*) zwischen 20 - 200** enthalten.*
5. In den abdeckbaren Behälter (z.B. Färbewanne) werden ca. 50 mL Ethanol (Brennspritqualität) eingefüllt und so abgedeckt, dass evtl. Alkoholdämpfe nicht durch Feuer entzündet werden kann.
 Davon entfernt wird der Gasbrenner entzündet.
6. In alle 6 sterilen RG werden mittels Pipettierhilfen mit der sterilen 10 mL-Pipette je 9.0 mL 0.9%ige NaCl-Lösung einpipettiert (vgl. auch Abb. 1).
7. In RG 10^0 : 1.0 mL der Hefe-Stamm-suspension (= unverdünnte Flüssigkultur) mittels der 1.0 mL-Messpipette inkl. Pipettierhilfe einlaufen lassen
8. RG verschliessen und dann sehr kräftig durchmischen: Schütteln, kräftiges Schlagen mit Zeig- und Mittelfinger auf untersten Teil des RG und Hin- und Herrollen des RG zwischen den Handflächen
9. Aus RG 10^0 wiederum 1.0 mL der nun bereits einmal verdünnten Hefesuspension in RG 10^{-1} überführen und kräftig durchmischen
10. In gleicher Weise weiter fahren bis alle 6 RG mit je 1.0 mL der Hefesuspension der vorausgehenden Verdünnungsstufe zusätzlich zu der bereits eingefüllten physiologischen Kochsalzlösung befüllt sind
11. Als Kontrolle wird zunächst 0.1 mL sterile Kochsalzlösung auf die Mitte der Malznährbodenoberfläche der K-Platten gegeben und sofort weiter gefahren nach Pkt. 12
12. Drigalski-Spatel sterilisieren:
 - Drigalskispatelkopfteil in Ethanol eintauchen und abtropfen lassen
 - kurz durch Gasbrennerflamme ziehen → anhaftender Alkohol entzündet sich
 - Drigalskispatel während Abflammen ständig drehen, bis Alkohol verbrannt ist
 - Deckel der MA-Platte leicht anheben, Spatel am Rand auf die sterile Nährbodenoberfläche aufsetzen und abkühlen lassen
13. In der Mitte aufgetropfte hefehaltige Flüssigkeit wird nun mit dem abgekühlten sterilen Drigalskispatel gleichmässig auf der MA-Oberfläche verteilt: durch Drehen der Bodenplatte und gleichzeitig durch Hin- und Herziehen des Drigalskispatels (cf. Abb. 2). Der Drigalskispatel wird anschliessend wieder in den Alkoholbehälter zurück stellen
 siehe auch Info: [Video 1](#) [Video 2](#) v
14. In gleicher Weise nun mit ab Pkt. 11 mit den Verdünnungsstufen 10^0 (unverdünnte Ausgangshefesuspension), dann 10^{-1} , dann 10^{-2} usw. bis 10^{-6} weiter fahren:
 - 0.1 mL aus dem RG 10^0 entnehmen und in die Mitte der Petrischale 10^0 platzieren, ausplattieren gemäss Pkt. 12+13
 - 0.1 mL aus dem RG 10^{-1} entnehmen und in die Mitte der Petrischale 10^{-1} platzieren und ausplattieren
 - usw. bis RG 10^{-6} → Petrischale 10^{-6} , ausplattieren

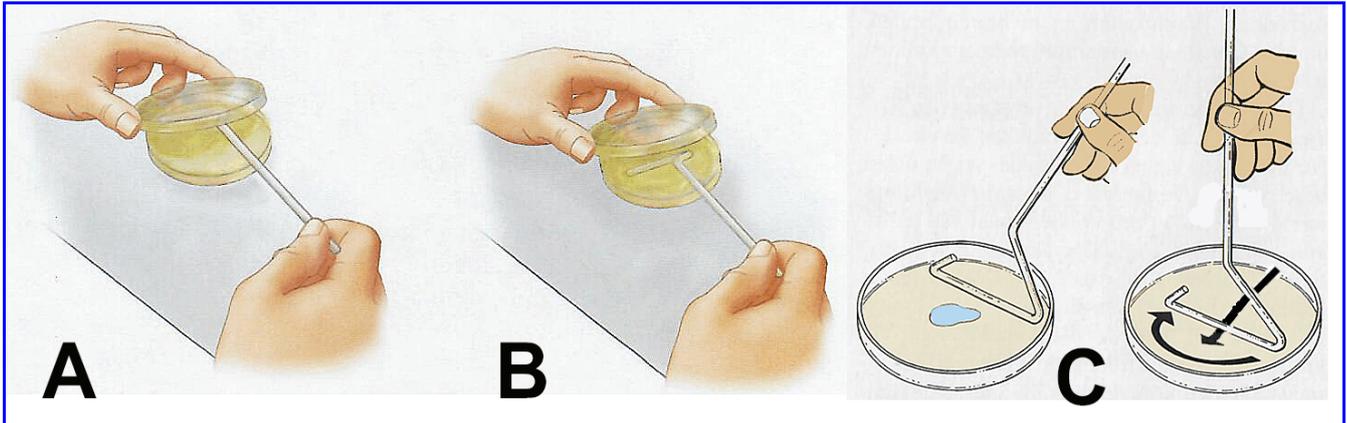


Abb. 2. Ausplattieren einer auf der Malzagaroberfläche eingebrachten Hefesuspension.

A: Abkühlen lassen des Drigalskispatels nach dem Flambieren mit Alkohol.

B: Nach dem Abkühlen wird der Drigalskispatel zur Probe hin- und darüber hinaus gezogen.

C: Nun wird sowohl der Bodenteil der Malzagarplatte mit dem kleinen Finger und dem Daumen in Kreisbewegung versetzt (grosser Rundpfeil) wie auch der Drigalskispatel durch eine geradlinige Hin- und Herbewegung mit der anderen Hand mehrfach sanft über die Agaroberfläche gezogen, bis er nicht mehr so mühelos gleitet (die hefehaltige Flüssigkeit ist damit gleichmässig über die gesamte Agaroberfläche verteilt worden).

Spartipp:

um sterile 1 mL-Messpipetten zu sparen, kann man auch in der umgekehrten Reihenfolge der Verdünnung pipettieren, nämlich von der höchsten Verdünnungsstufe 10^{-6} bis zur unverdünnten Ausgangsstammhefesuspension:

- 0.1 mL aus RG 10^{-6} → in Petrischale 10^{-6} , ausplattierenflick
- *mit der gleichen 1 mL-Messpipette* (!) 0.1 mL aus RG 10^{-5} in Petrischale 10^{-5} , ausplattieren
- usw. bis RG 10^0 → Petrischale 10^0 , ausplattieren

15. Malzagarpetrischalen stapeln, umkehren (d.h. auf den Kopf stellen: Bodenplatte mit dem Malzagar schaut nach oben), bebrüten:

- ein bis mehrere Tage entweder lichtgeschützt bei Zimmertemperatur stehen lassen, oder
- 1 - 2 Tage im Brutschrank bei 30°C

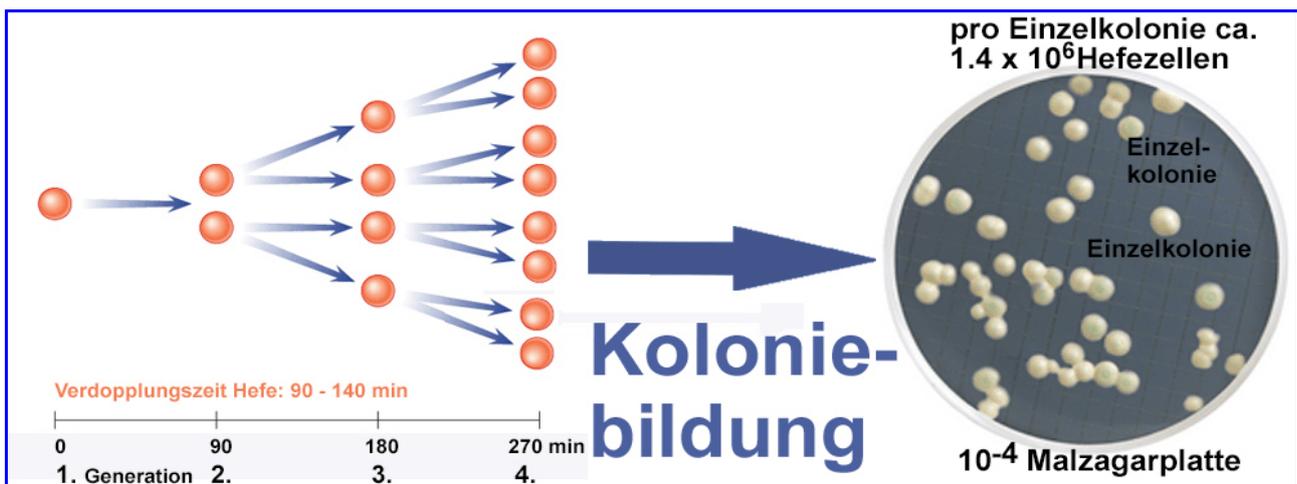


Abb. 3. Durch exponentielles Wachstum entstehen aus Einzel- oder Wenigzellhaufen sehr rasch aus dieser einen (oder wenigen) Zellen eine von blossen Auge sichtbare Anhäufung von Nachkommen innerhalb relativ kurzer Zeit: sog. **Kolonien**. Zutreffender ist allerdings der Begriff KBE = koloniebildende Einheiten, da nicht jeder Kolonie ursprünglich nur eine einzige vermehrungs-fähige Hefezelle zugeordnet werden darf. KBE ist also die Mindestzahl vermehrungsfähiger Zellen (= Lebendzellzahl). Als kürzeste Generationszeit wurde 71 min publiziert.

**16. Auswertung:** gewachsene Hefekolonien auszählen

- die Hefezellen haben sich in der Zwischenzeit geteilt und damit vermehrt, bis aus ursprünglichen ausplattierten Einzelzellen innerhalb der Wachstumszeit von mehreren Tagen ein ganzer "Nachwuchshaufen" = von bloßem Auge sichtbare **Kolonie** entstanden ist (vgl. Abb. 3)
- Diese Hefekolonien werden gezählt, sobald sie gut zu erkennen sind; es werden dazu Malzplatten ausgewählt, die zwischen **20 und 200 Kolonien** enthalten
- Aus den Ergebnissen der gleichbehandelten Platten wird der **Mittelwert** berechnet
- Koloniezahl (KBE-Wert): KBE-Wert durch Verdünnungsfaktor dividieren → Zahl der vermehrungsfähigen Hefezellen in 1 mL Stammlösung = Lebendkeimzahl bzw. Lebendzellzahl

Beispiel:

KBE-Wert auf MA-Platten 10^{-4} : 84 bzw. 98 Kolonien

Mittelwert $x = 91 \text{ Keime}/0.1 \text{ mL} = 910 \text{ Keime/mL}$ der 10^4 -fach verdünnten Hefezellsuspension

1 mL der Stammlösung (= ursprüngliche unverdünnte Hefezellsuspension) enthält $910 \times 10^4 \text{ Keime/mL} = 9'100'000 = 9.1 \times 10^6 \text{ Keime/mL}$ (9.1 Millionen Keime/mL)