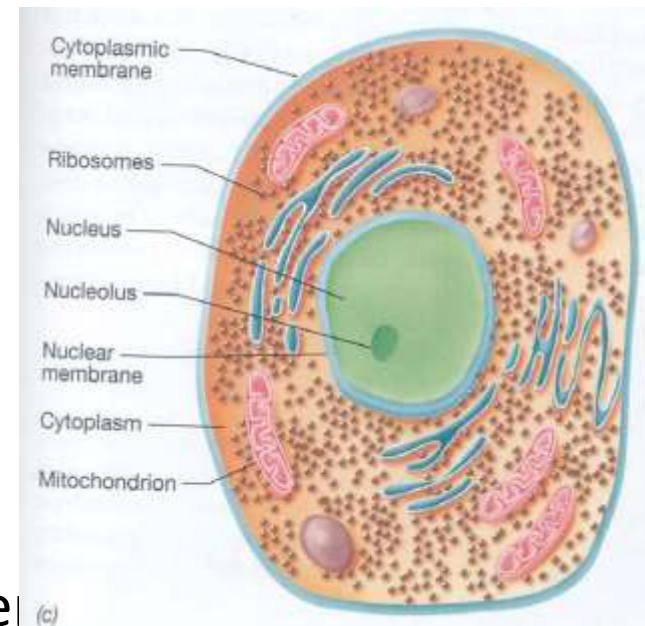


Bestimmung der Zellzahl von Bäckerhefe

Hefen: eukaryotische Mikroorganismen

- Fakultative Anaerobier
- Hauptbestandteile der Zellwand: Glykan und Mannan
- Im Cytoplasma: Glykogen- und Lipidtröpfchen, Phosphatgranula
- Modellorganismen in der Genetik, da sie im haploiden Zustand sehr stabil sind und Mutanten einfach isoliert werden können



Brock Mikrobiologie

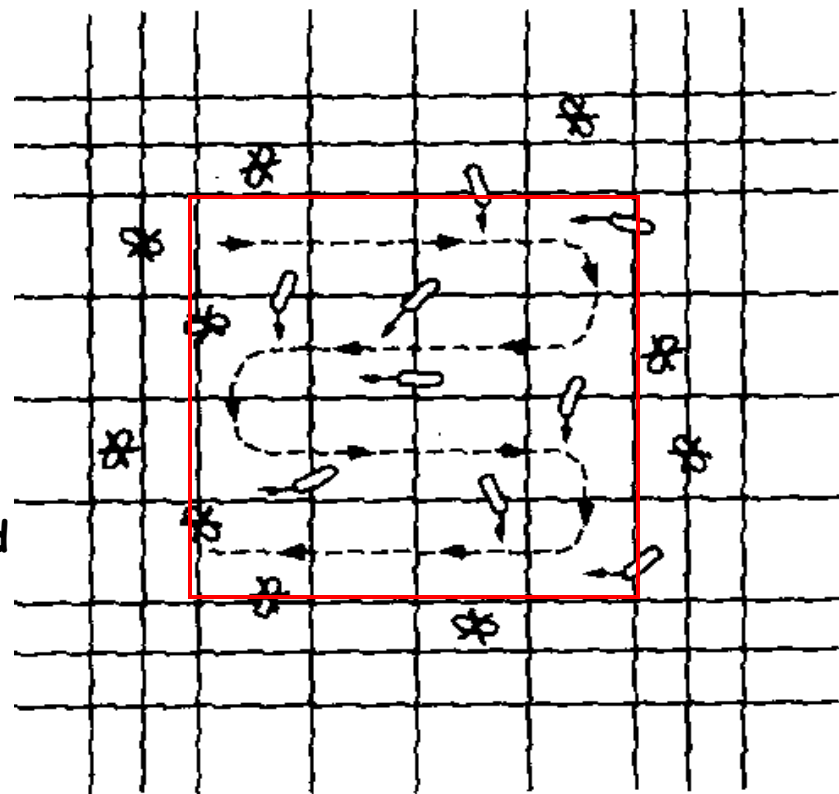
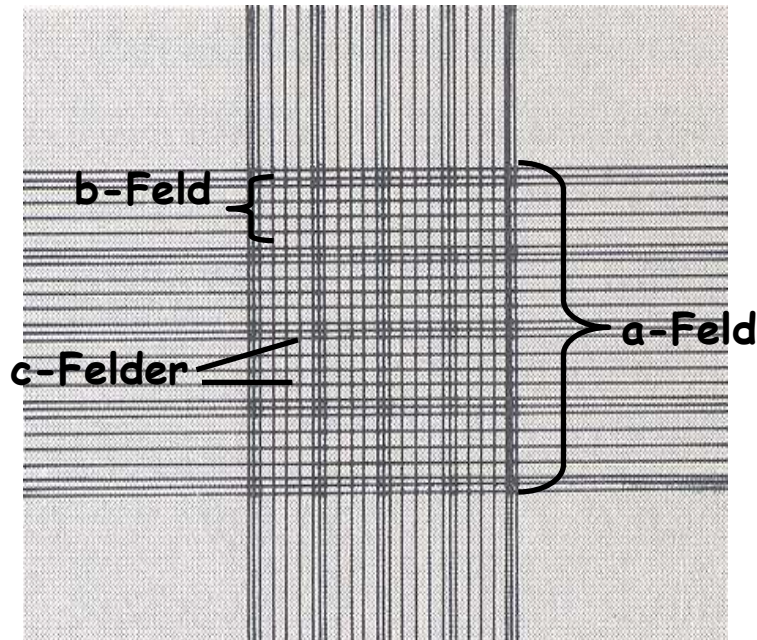
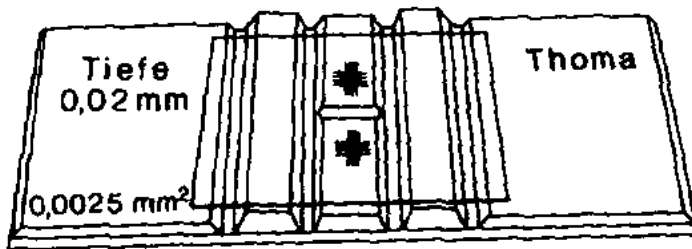
Ziel des Experiments

Bestimmung der Zellzahl mit zwei Methoden

Eine Population einzelliger Mikroorganismen besteht aus vermehrungsfähigen und vermehrungsunfähigen Zellen

- Gesamtzellzahl = vermehrungsfähige + vermehrungsunfähige Zellen
- Lebendzellzahl/Keimzahl = vermehrungsfähige Zellen

Teilversuch a: Thoma-Zählkammer zur Bestimmung der Gesamtzellzahl



Berechnung des Kammerfaktors

Fläche eines c-Feldes = $0,0025 \text{ mm}^2$

Höhe eines c-Feldes = $0,1 \text{ mm}$

Volumen eines c-Feldes = $0,0025 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} = 0,00025 \text{ mm}^3$

Volumen eines Liters = $1 \text{ dm}^3 = 1.000.000 \text{ mm}^3$

⇒ Das Volumen eines c-Feldes entspricht dem 4×10^9 ten Teil des
Volumen eines Liters.

⇒ eine Zelle pro c-Feld entspricht 4×10^9 Zellen pro 1 Liter

Berechnung der Zellzahl pro Liter

Zellzahl c-Feld x Kammerfaktor x Verdünnung = Zellzahl/Liter

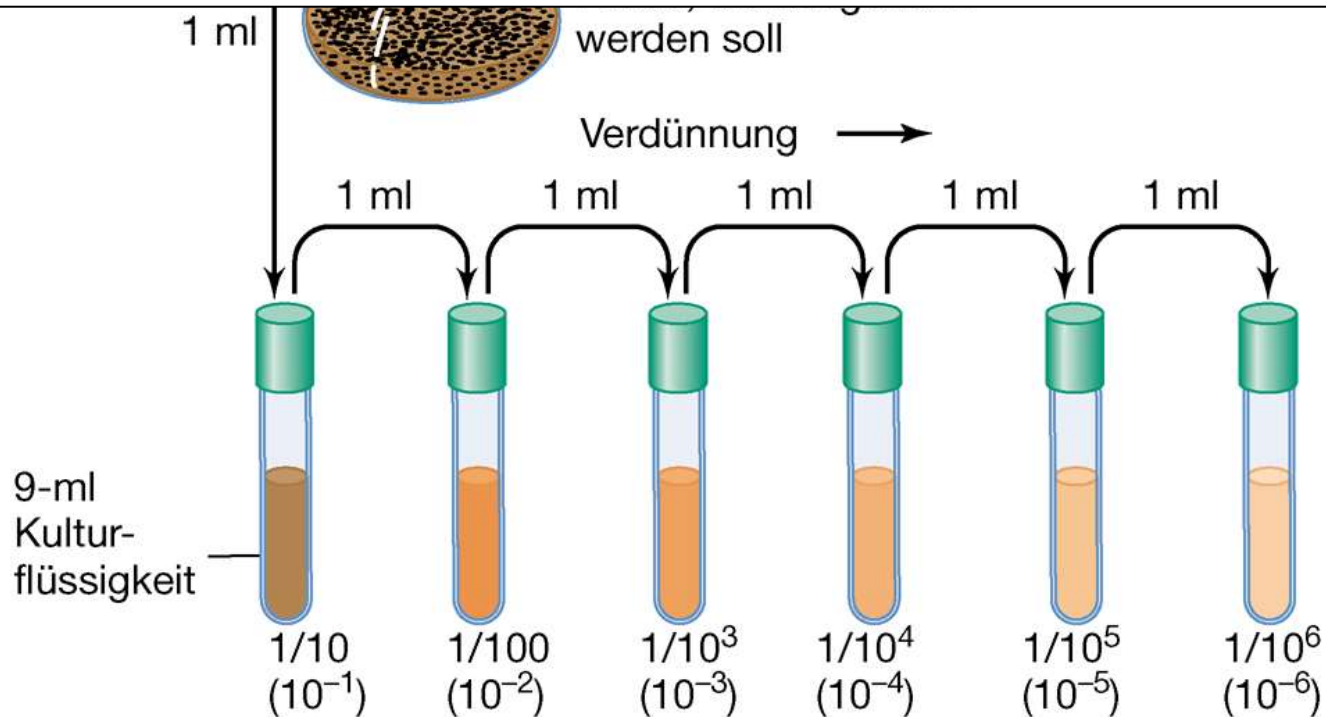
Beachte: Hefesuspension 5 g /L

Gewünschte Angabe: Zellzahl/g Hefe

1. Schritt: Herstellung einer Verdünnungsreihe



Entsprechende Verdünnung zur Betrachtung in der Thoma-Kammer auswählen
→ ca. 10-40 Zellen pro b-Feld



Teilversuch b: Bestimmung der Lebendzellzahl mit dem Plattengussverfahren

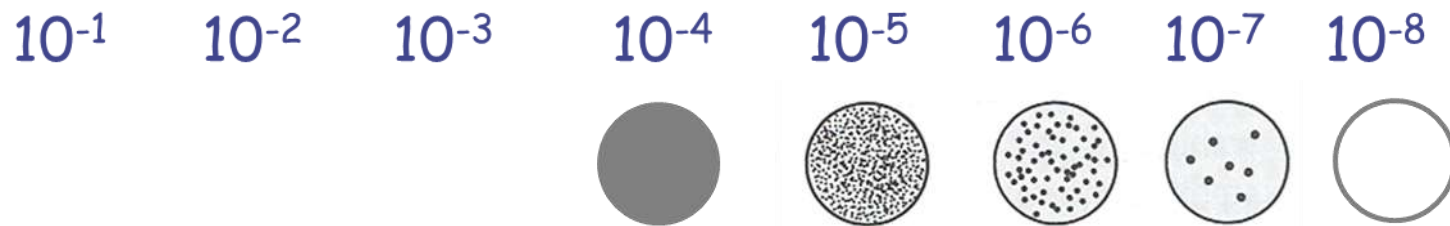
- es werden nur vermehrungsfähige Zellen erfasst
- ABER: es werden nicht unbedingt alle vermehrungsfähigen Zellen erfasst:
 - Selektive Anzuchtbedingungen können dazu führen, dass bei Mischpopulationen nur ein Bruchteil der tatsächlich vorhandenen Keime erfasst wird
 - zu kurze Bebrütungszeiten resultieren in einer geringen Koloniezahl, da ein Teil der Kolonien noch zu klein sein und beim Auszählen übersehen werden kann

Durchführung Teilversuch b

- Leere sterile Petrischale auf der Unterseite beschriften (Name, Gruppennummer, Datum)
- 1 ml der entsprechenden Verdünnung (10^{-4} bis 10^{-8}) unter sterilen Bedingungen (am Brenner) in die sterile Petrischale pipettieren
- Für jede Verdünnung ein Reagenzglas mit dem bei 48 °C flüssig gehaltenen Hefenährboden aus dem Wasserbad entnehmen und unter sterilen Bedingungen neben die Hefesuspension in die Petrischale gießen
- Das Reagenzglas muss SOFORT vom Gruppenpartner ausgespült werden!
- In einer „achtförmigen“ Bewegung Agar und Probensuspension vermischen, 20- 30 min erkalten lassen und dann die Petrischalen mit dem Deckel nach unten 2 d bei 28 °C inkubieren

Bestimmung der Koloniebildenden Einheiten (KBE)

- Auswertbare Platten: KBE zwischen 30 und 300



- Beim Plattenguss können Kolonien sowohl auf, als auch im und unter dem Agar wachsen
- Doppelbestimmung: Ergebnisse des Gruppenpartners mit berücksichtigen!

Berechnung der Lebendzellzahl

$$\text{KBE} \times 1/\text{Verdünnungsstufe} \times 10 = \text{KBE/ml}$$

Ergebnis angeben in KBE/ 1g Hefe!

Beachte: Ursuspension → 5g Hefe/Liter

Mikroskopie

- Betrachtung ausgesuchter Kolonien unter dem Mikroskop im Phasenkontrast