

## Experiment 4

### Experimente mit Bäckerhefe

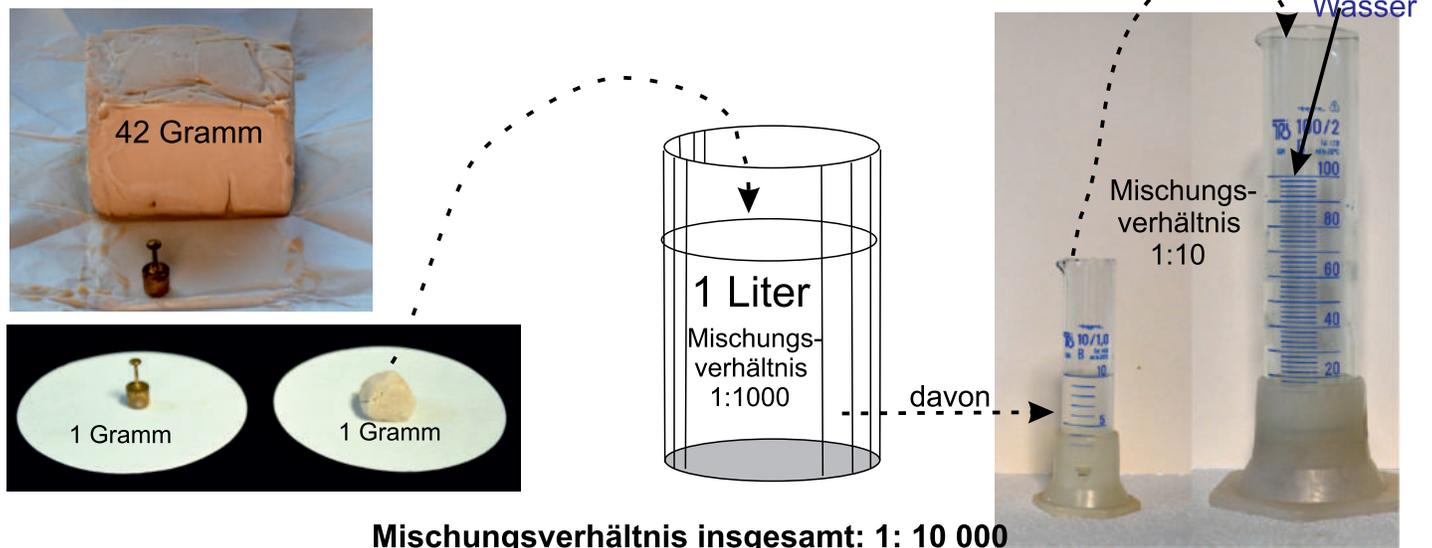
**Ergebnis:** Es wird die Anzahl der Hefezellen in einem Gramm Backhefe bestimmt.  
Mit dem Vitalitätstest werden lebende und abgestorbene Zellen festgestellt.  
Unter Verwendung einer Zuckerlösung steigt die Anzahl der sprossenden Hefen.

**Durchführung:** Die Anzahl der Hefezellen wird durch das Mischen mit Wasser und mithilfe einer Zählkammer ermittelt.  
Der Vitalitätstest wird mit Methylenblau ausgeführt. Abgestorbene Zellen färben sich intensiv blau.  
Wird der Hefesuspension Haushaltszucker zugegeben, dann bildet sie verstärkt Sprossen aus.

**Arbeitschutzhinweise:** Für den Arbeitsschutz ist die übliche Hygiene ausreichend, da bis auf das Methylenblau mit Nahrungsbestandteilen gearbeitet wird. Methylenblau ist der wesentliche Bestandteil der Schultinte und findet in der homöopathischen Heilkunde Anwendung.

#### 1. Bestimmung der Hefezellen in einem Gramm Bäckerhefe

Von der gekauften Hefe wird ein Gramm abgewogen und in einem Liter Wasser „aufgelöst“ - wie man es im normalen Sprachgebrauch sagt. In Wirklichkeit lösen sich die Hefezellen nicht auf. Sie verteilen sich im Wasser und sind wegen der geringen Größe für das Auge nicht mehr sichtbar. Richtig ist, den Vorgang als Suspensieren zu bezeichnen, weil die Mischung aus Hefezellen und Wasser eine Suspension ist. In dem Liter Suspension sind die Hefezellen aber noch zu dicht beieinander und das Zählen würde sehr viel Zeit in Anspruch nehmen. Deshalb wird die Suspension gut durchmischt und es werden 10 ml entnommen, die mit 90 ml Wasser zu 100 ml aufgefüllt werden. Das Vorgehen entspricht dem Suspensieren von einem Gramm Hefe in 10 Liter Wasser. Würde man 0,1 Gramm Hefe in einem Liter Wasser verteilen, dann würde dasselbe Verdünnungsverhältnis entstehen. Je geringer jedoch die Masse der Hefe ist und je geringer das Volumen an Wasser, desto größer werden die Messfehler. Das fehlerfreie Abwiegen bzw. Abmessen gibt es nicht und deshalb werden entsprechend sichere Massen und Mengen verwendet. Von der letztlich 100 ml umfassenden Suspension wird nur ein winziger Teil von gerade einmal 20 Mikroliter für das Befüllen der Zählkammer benötigt.



Die Zählkammer ist ein technisches Hilfsmittel aus Glas. Sie besitzt ein oder zwei Zählnetze. Diese bestehen aus sehr kleinen Linien, die ein typisches Muster ergeben, welches sich aus Quadraten mit unterschiedlichem Flächeninhalt zusammensetzt. Da die Höhe über den Quadraten bekannt ist, lässt sich das Volumen in Kubikmillimeter errechnen. Die Quadrate dienen der Orientierung beim Zählen der Hefezellen.

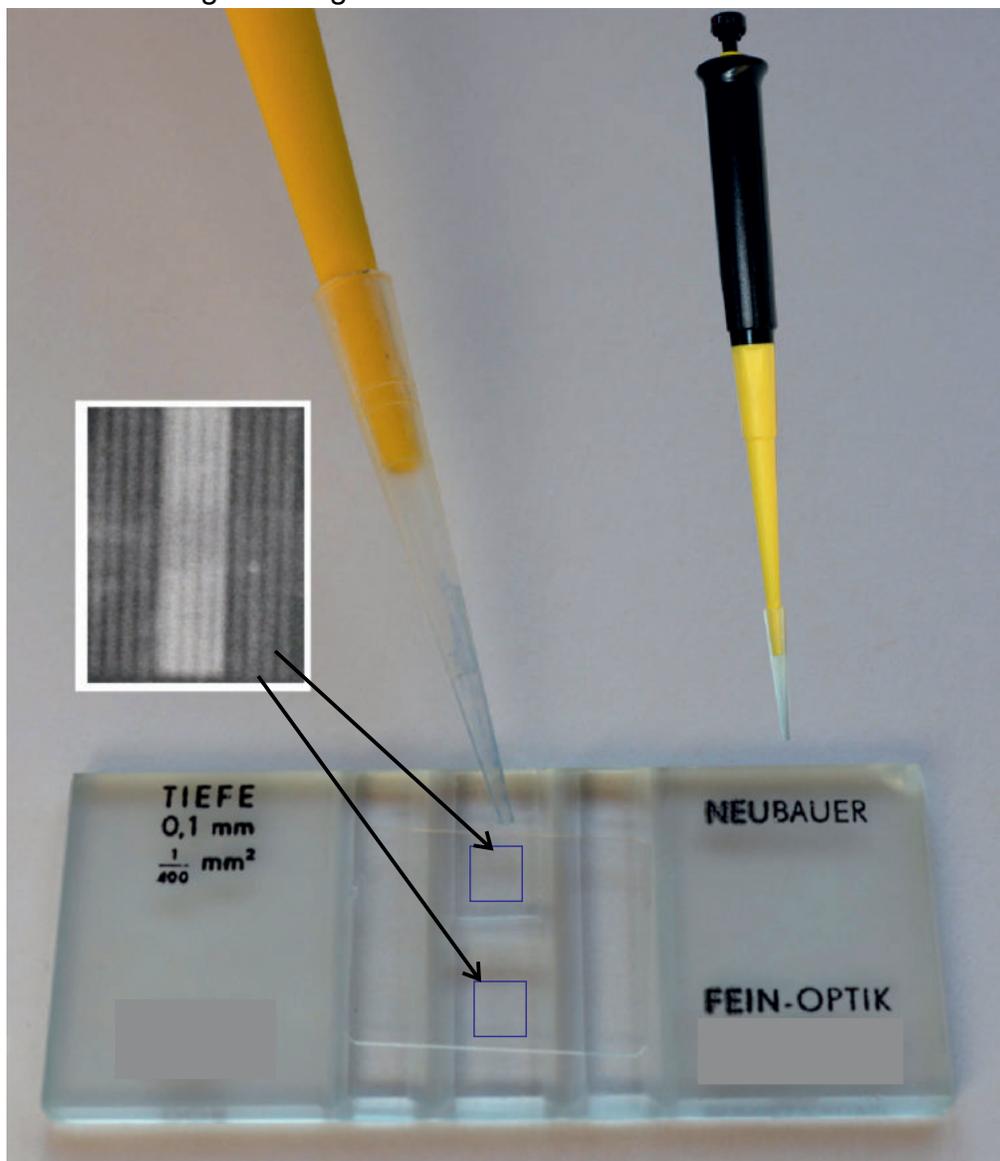
Die Zählkammer wird mit einem besonderen Deckglas versehen. Dieses hat eine definierte Dicke, um einen Abstand zum Zählnetz von exakt 0,1 Millimeter zu erzeugen. Das ist wichtig für die Bestimmung des Volumens. Ist das Volumen bekannt, so kann die Anzahl der Hefezellen leicht errechnet werden.

Bei der zu verwendenden Zählkammer werden die Hefezellen in vier Quadraten von je ein mal ein Millimeter gezählt. Da die Höhe 0,1 Millimeter beträgt wird die Anzahl die Zellen in 0,4 Kubikmillimeter bzw. 0,4 Mikrolitern erfasst ( $4 \text{ mm}^2 \cdot 0,1 \text{ mm} = 0,4 \text{ mm}^3 = 0,4 \text{ Mikroliter}$ ).

Werden beispielsweise 275 Hefezellen gezählt, so ist das Verdünnen zu korrigieren und mit dem Faktor 10 zu multiplizieren. Das Ergebnis ist mit 2,5 zu multiplizieren, um auf die Anzahl für einen Mikroliter zu gelangen ( $2750 \times 2,5 = 6875 \text{ Hefezellen/Mikroliter}$ )

Um die Anzahl der Hefezellen für einen Milliliter zu erhalten, muss mit dem Faktor 1000 multipliziert werden, was 6 875 000 Hefezellen pro Milliliter ergibt. Die erneute Multiplikation mit dem Faktor 1000 ergibt letztendlich die Anzahl pro Liter (6 875 000 000). In einem Gramm Hefe sind also 6 Milliarden 875 Millionen Hefezellen enthalten. Der Faktor für die gezählten Zellen ist somit 25 000 000.

Die Abbildung zeigt eine Zählkammer nach Neubauer, eine Pipette zum Befüllen der Kammer sowie eine Detailvergrößerung des Zählnetzes.

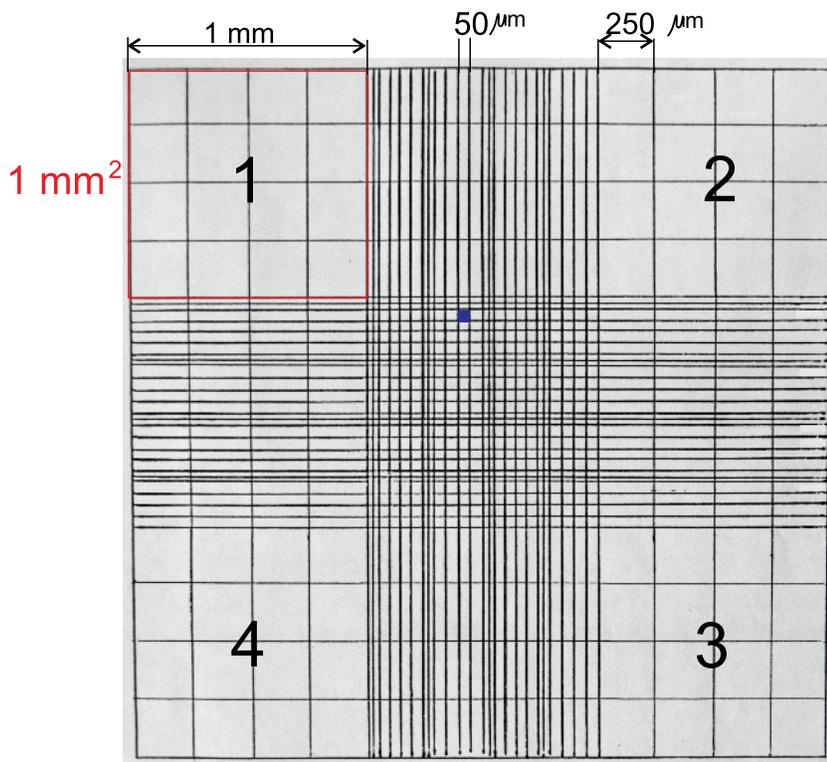


Dort, wo die blauen Markierungen sind, liegen die Zählnetze. Sie sind mit dem Auge nur schwach wahrzunehmen. In der Detailaufnahme sind Linien zu erkennen. Erst unter dem Mikroskop werden die quadratischen Strukturen sichtbar.

Die Zählkammer trägt Beschriftungen: Die Tiefe entspricht der Höhe unter dem Deckglas.  $\frac{1}{400}$  Quadratmillimeter ist die Angabe für den Flächeninhalt des kleinsten Quadrates. Neubauer ist der Name des Erfinders der Kammer.

Die Detailaufnahme ist sehr undeutlich. Erst im Mikroskop ist das Zählnetz genauer zu erkennen.

## Benutzung des Zählnetzes



0,250 mm = 250 Mikrometer (μm)

0,050 mm = 50 Mikrometer

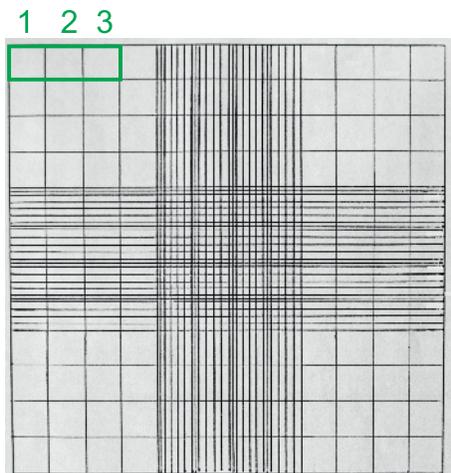
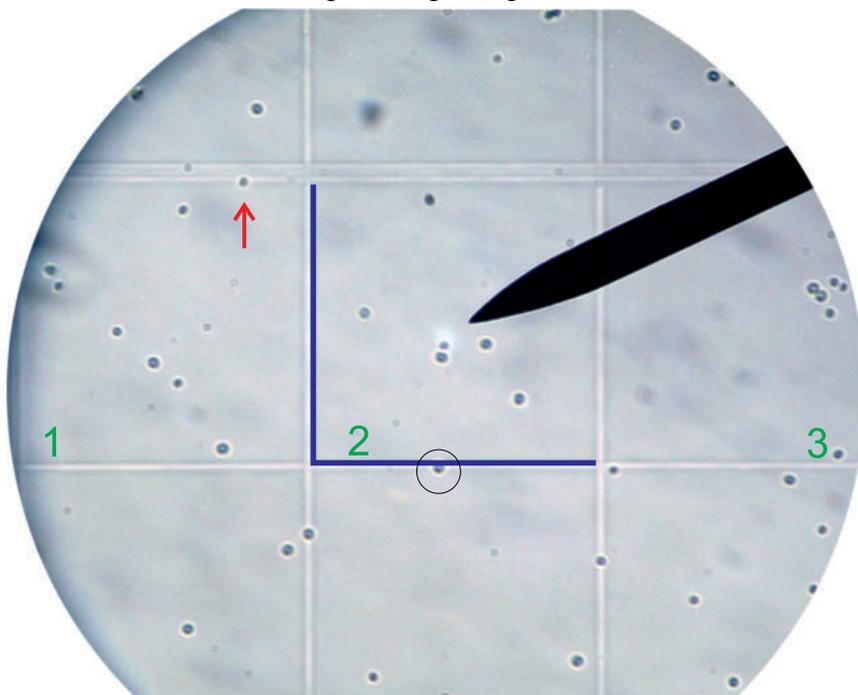
Der Flächeninhalt des rot markierten Eckquadrates beträgt 1 mm<sup>2</sup>.

Zur Bestimmung der Anzahl der Hefezellen sind die Eckquadrate 1 bis 4 zu benutzen. Die darin befindlichen Hefezellen werden gezählt. Als Erleichterung dienen die im Eckquadrat eingebrachten 16 Gruppenquadrate. An diesen kann man sich orientieren und Zählfehler, wie Doppelzählung, vermeiden.

Das Quadrat mit Länge und Breite von 0,05 mm besitzt den kleinsten Flächeninhalt. Es sind 0,0025 Quadratmillimeter = 1/400 mm<sup>2</sup>.

Die Angabe  $\frac{1}{400}$  mm<sup>2</sup> ist auf der Zählkammer vermerkt.

Für das Zählen der Hefezellen kann die 100fache oder 400fache Vergrößerung benutzt werden. Wer bereits mehr Erfahrung besitzt, der wird mit der geringeren Vergrößerung arbeiten und so etwas schneller zum Ergebnis gelangen.



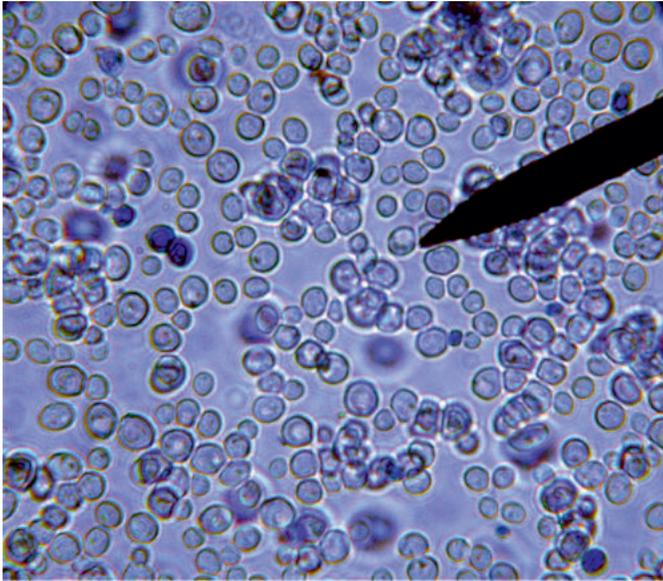
Blick auf die ersten drei Gruppenquadrate des Eckquadrates links oben bei 100facher Vergrößerung. Ein gedachtes „L“ sorgt für eine klare Zählregel, wenn Hefezellen auf Begrenzungen liegen. Die umrandete Zelle wird beim Zählen dem Kästchen (2) zugewiesen. Die Zelle, auf die der rote Pfeil zeigt, wird nicht mit gezählt.

In einem Eckquadrat befinden sich erfahrungsgemäß zwischen 60 bis 80 Zellen, sodass ein Ergebnis im Bereich von 240 bis etwa 300 gezählten Zellen entsteht. Das Zählergebnis ist mit dem Faktor 25 000 000 zu multiplizieren, um die Anzahl der Hefezellen in einem Gramm zu erhalten.

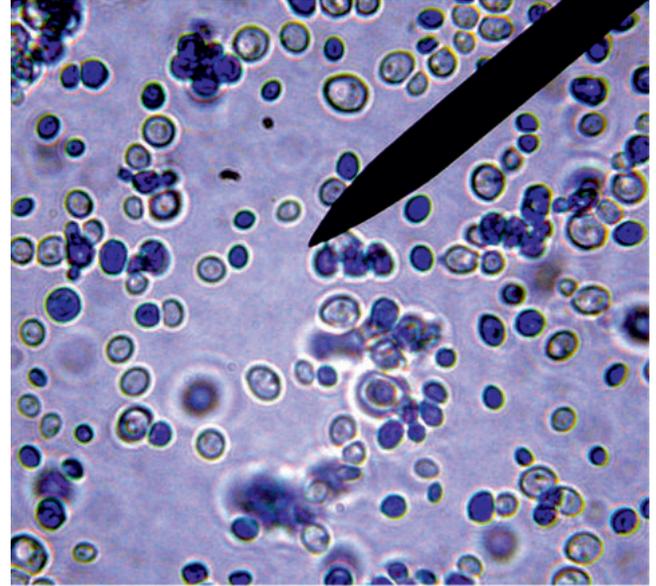
## 2. Vitalitätstest

Mit einem einfachen Versuch lassen sich lebende Hefezellen von abgestorbenen unterscheiden. Tote Hefezellen haben eine beschädigte Zellmembran. Sie nehmen das Methyleneblau auf und sind deshalb gleichmäßig dunkelblau gefärbt.

Durchführung: Ein erbsengroßes Hefestück in 100 Milliliter Wasser geben und mit einem Teelöffel gut verrühren. Auf einen Objektträger einen kleinen Tropfen Schultinte geben und einen weiteren kleinen Tropfen der Hefesuspension. Die Tropfen mit der Löffelspitze vermengen und mit einem Deckglas abdecken. Das Präparat kann sofort mikroskopiert werden.



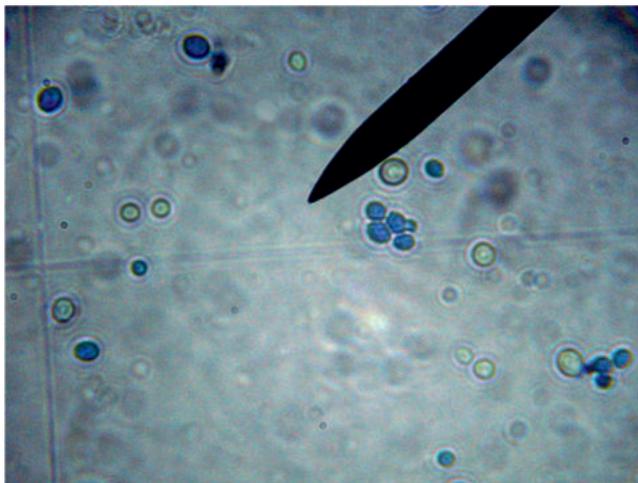
Das Präparat aus frischer Bäckerhefe enthält überwiegend lebende Zellen.



Präparat mit zahlreichen toten Zellen.

Die für das Vitalpräparat hergestellte Hefesuspension kann für kleine Versuche benutzt werden. Dafür wird die Hefesuspension in geeigneten Gefäßen verteilt. In diesen Gefäßen können die unterschiedlichsten Chemikalien auf ihre Gefährlichkeit für Hefezellen untersucht werden zum Beispiel Badreiniger, Spülmittel oder spezielle Haushaltsreiniger. Dabei sind die Menge der Hefesuspension und die Menge der Haushaltschemikalie zu notieren. Die Gefäße mit Alufolie verschließen und nach 24 Stunden den Vitaltest durchführen.

Zuverlässigere Ergebnisse entstehen, wenn das Probenmaterial für das Befüllen der Zählkammer verwendet wird und vitale sowie tote Zellen ausgezählt werden.

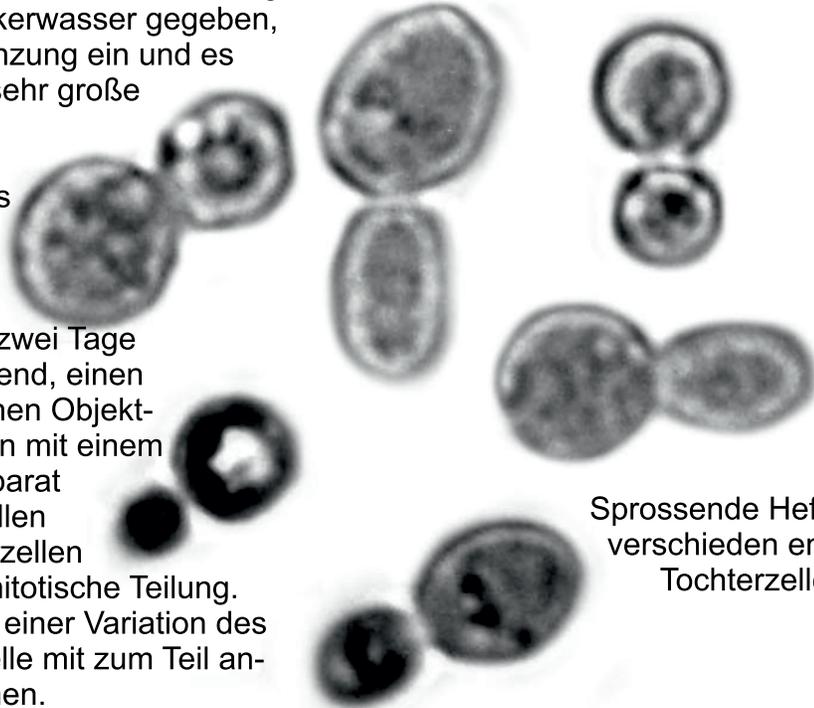


Vitale und tote Hefezellen in einer Zählkammer.

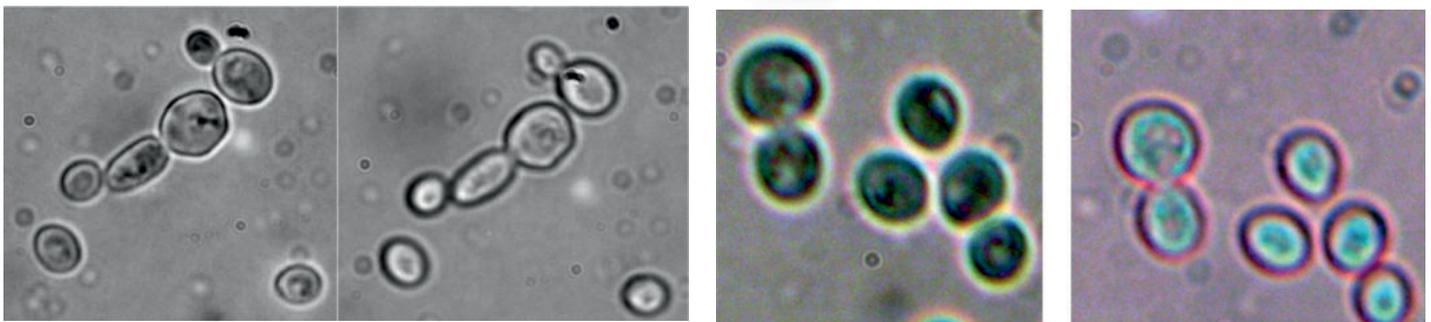
## Die Hefe ist ein Sprosspilz

Die Fortpflanzung findet auf asexuelle Weise durch Sprossung statt. Die Mutterzelle bildet einen Spross und schnürt diesen ab. In der Literatur hat sich dafür auch die Bezeichnung der Knospe, die durch Knospung freigesetzt wird, verbreitet. Der biologischen Einteilung folgend sind es Sprossen.

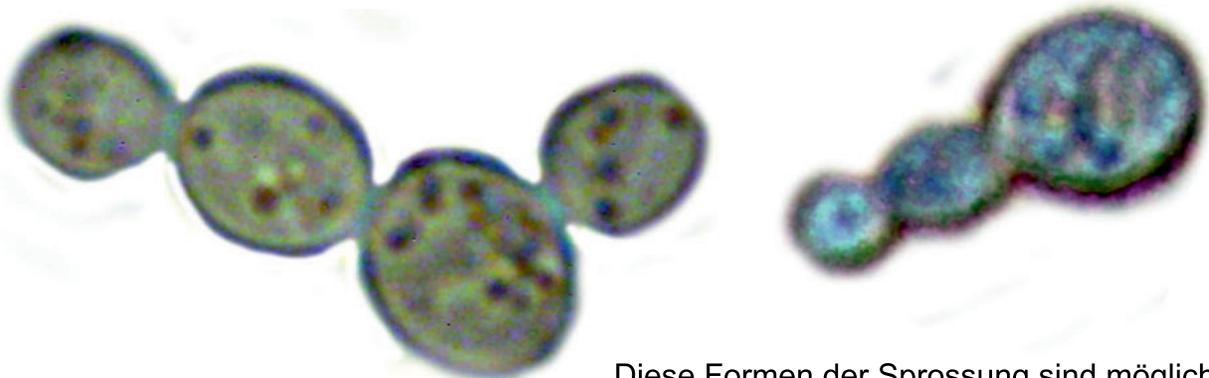
In der aus Backhefe hergestellten Suspension sind stets sprossende Hefezellen aufzufinden. Die Sprossen sind jedoch recht klein. Wird ein erbsengroßes Stück Hefe in ein Glas mit Zuckerwasser gegeben, dann setzt eine starke Fortpflanzung ein und es können bereits nach Stunden sehr große Sprossen beobachtet werden. Ein halber Teelöffel mit Haushaltszucker und 100 ml warmes Wasser sind ausreichend. Bei Zimmertemperatur setzt die Sprossung schnell ein. Die Suspension kann auch ein bis zwei Tage stehen bleiben. Es ist ausreichend, einen Tropfen der Suspension auf einen Objektträger zu übertragen und diesen mit einem Deckglas zu versehen. Im Präparat sind die sprossenden Mutterzellen leicht zu erkennen. Die Tochterzellen erhalten ihren Zellkern durch mitotische Teilung. Die Mitose erfolgt jedoch unter einer Variation des Erbmaterials, um die Tochterzelle mit zum Teil anderen Eigenschaften zu versehen.



Sprossende Hefezellen mit verschieden entwickelten Tochterzellen



Durch Veränderung des Objektivabstandes kann die Abrissstelle besser beobachtet werden.



Diese Formen der Sprossung sind möglich, wenn die Lebensbedingungen sehr gut sind.