

Stephanie [REDACTED]
BTA-UH 1
Gruppe A
Partner: Ljiljana [REDACTED]

Einzelprotokoll
über den Versuch

„Hefe“

Gesamtzellzahl und Lebendzellzahl

Mikrobiologisches Praktikum
Berufskolleg Kartäuserwall
Kartäuserwall 30, Köln

Hr. Reckendorfer

Zellzahlbestimmung bei Saccharomyces cerevisiae

Aufgabe

In diesem Versuch wollen wir die Gesamt- und die Lebendzellzahl eines Gramms Bäckerhefe bestimmen. Die **Gesamtzellzahl** umfasst alle in der Suspension enthaltenen Zellen, also lebende und tote. Bei der **Lebendzellzahl** werden nur die Zellen berücksichtigt, die noch Kolonien ausbilden können, also lebendig sind. Die Gesamtzellzahl ermitteln wir mit Hilfe einer Zählkammer, die Lebendzellzahl durch das Ausstreichen auf Platten und das Zählen der gewachsenen Kolonien.

Versuchsaufbau

1. *Mikroorganismus:* Saccharomyces cerevisiae

2. *Medium:*

	Originalrezept	Umrechnung für 180 ml
Aqua dest.	1000 ml = 94,5 %	170,1 ml
Hefeextrakt	1,0 %	1,8 g
Saccharose	3,0 %	5,4 g
Agar	1,5 %	2,7 g

3. *Geräte und Chemikalien:*

- 6 sterile Petrischalen
- Drigalskispatel
- 1000 ml-Erlenmeyerkolben
- Becherglas
- physiologische Kochsalzlösung 0,9%
- 9 Kulturröhrchen
- 1 ml-Pipette und Pipettierhilfe
- Rührfisch und Magnetrührer
- Trockenschrank
- Brutschrank
- Thoma-Kammer
- Mikroskop

Durchführung

- nach dem oben genannten Rezept wird ein HPG-Agar angesetzt und auf den pH-Wert 5,6 eingestellt
- in den sterilen Petrischalen werden 6 Platten gegossen und in Trockenschrank bei 50°C ausgehärtet (Boden nach oben)
- 2 g Bäckerhefe werden in 25 ml physiologischer Kochsalzlösung suspendiert
- von der Suspension wird eine 10er-Verdünnungsreihe angelegt: die Suspension ist V_0 , wird verdünnen bis V_9
- von den Verdünnungsstufen werden die zählbaren mit Hilfe einer Thomakammer ausgezählt: 4 Großquadrate
- von den Verdünnungsstufen V_4 bis V_9 werden jeweils 0,1 ml mit dem Drigalskispatel auf den getrockneten Platten ausgestrichen (man beachte, dass keine Pfützen auf dem Agar stehen bleiben, besonders am Rand der Platte!)
- die Petrischalen werden 3 Tage bei 37°C bebrütet und dann ausgewertet

Beobachtung

Beim Auszählen der Großquadrate bin ich zu folgendem Ergebnis gekommen:

Verdünnungsstufe	Zellzahl je GQ
V0 = 2g/25ml	unzählbar
V1 = 1:10	unzählbar
V2 = 1:100	21, 28, 25, 41
V3 = 1:1000	6, 5, 6, 8
V4 = 1:10000	3, 0, 0, 3
V5 = 10 ⁻⁵	1, 0, 0, 1
V6 = 10 ⁻⁶	---
V7 = 10 ⁻⁷	---
V8 = 10 ⁻⁸	---
V9 = 10 ⁻⁹	---

Beim Auszählen der Kolonien auf den HPG-Agarplatten habe ich diese Werte ermittelt:

Verdünnungsstufe	Anzahl d. Kolonien
V4	unzählbar
V5	unzählbar
V6	110
V7	54
V8	17
V9	[81]

Die Kolonien sind milchig weiß. Auf den Platten mit vielen Kolonien = niedrige Verdünnung ist ihr Durchmesser geringer als auf den Platten mit weniger Kolonien = hohe Verdünnung. Die Kolonien sind glänzend und erhaben. Sie besitzen einen weißen Ring um das Zentrum.

Auswertung

Zur Auswertung der Gesamtzellzahl muss man wissen, dass eine Großquadrat der Thomakammer ein Volumen von 0,004 ml enthält. Um einen Vergleichswert zu haben, bildet man den Mittelwert aus mehreren gezählten Großquadraten und rechnet das Ergebnis auf Zellen/ml um. Dafür muss man mit dem Umrechnungsfaktor der Thomakammer = 250.000 multiplizieren:

Verdünnungsstufe	Zellzahl je GQ	Mittelwert	Keimzahldichte: Zellen / ml
V0 = 2g/25ml	unzählbar	---	---
V1 = 1:10	unzählbar	---	---
V2 = 1:100	21, 28, 25, 41	28,75	7187500
V3 = 1:1000	6, 5, 6, 8	6,25	1562500
V4 = 1:10000	3, 0, 0, 3	1,5	375000
V5 = 10 ⁻⁵	1, 0, 0, 1	0,5	125000
V6 = 10 ⁻⁶	---	---	---

Es wurde jeweils der arithmetische Mittelwert der Daten gebildet. Um an die Keimzahldichte von V0 zu gelangen, muss man sich folgender Formel bedienen:

Keimzahldichte von V0 = Verdünnungsfaktor * Keimzahl der Verdünnungsstufe

Keimzahldichte: Zellen / ml	Verdünnungs- faktor	V0
---	10^0	---
---	10^1	---
7187500	10^2	$7,2 \times 10^9$
1562500	10^3	$15,6 \times 10^9$
375000	10^4	$37,5 \times 10^9$
125000	10^5	125×10^9
---	10^6	---
---	10^7	---
---	10^8	---
---	10^9	---

Mir erschien es sinnvoll, den Mittelwert aus den gewonnenen Daten zu ermitteln. Danach ergibt sich eine durchschnittliche **Gesamtzellzahl von $4,6 \times 10^9$** Zellen in V0. Zur Auswertung der Lebendkeimzahl legt man die folgende Tabelle an:

Verdünnungs- stufe	Anzahl d. Kolonien	Zellen / ml (=x10000)	Verdünnungs- faktor	V_0	Gewichtungs- faktor
V4	unzählbar	---	10^4	---	---
V5	unzählbar	---	10^5	---	---
V6	110	1100000	10^6	$1,1 \times 10^{12}$	100
V7	54	540000	10^7	$5,4 \times 10^{12}$	10
V8	17	170000	10^8	$1,7 \times 10^{13}$	1
V9	[81]	[810000]	10^9	---	---

Da das auf der Platte ausgestrichene Volumen 0,1ml beträgt, befinden sich in 1ml 10.000 Mal soviel Zellen. Diesen Wert muss man mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multiplizieren, um an die Zellzahl in der Ausgangssuspension = V0 zu gelangen. Aufgrund statistischer Fehler rechnet man bei dieser Methode dann noch mit Gewichtungsfaktoren. An den Wert der Lebendzellzahl kommt man dann durch folgende Rechnung:

$$\frac{V_6 * GF_6 + V_7 * GF_7 + V_8 * GF_8}{GF_6 + GF_7 + GF_8}$$

Es ergibt sich in V0 eine durchschnittliche **Lebendzellzahl von $3,01 \times 10^{12}$** Zellen. Da sich in V0 2g Bäckerhefe befinden, müssen in 1g genau halb so viele Zellen enthalten sein:

Gesamtzellzahl:	$4,6 \times 10^9 / 2 = 2,3 \times 10^9$
Lebendzellzahl:	$3,01 \times 10^{12} / 2 = 1,5 \times 10^{12}$

Diese Werte ergeben keinen Sinn, da die Lebendzellzahl nicht über der Gesamtzellzahl liegen kann. Bei einer der beiden Messungen müssen Fehler aufgetreten sein.

Fehlerdiskussion

Die Ursache für diese Ergebnisse kann darin liegen, dass zum einen die Suspensionen der Verdünnungsreihe unsauber pipettiert wurden und so in die höheren Verdünnungen zu viele Zellen gelangt sind. Es kann auch sein, dass die Suspensionen nicht genug durchmischt waren, als die Proben entnommen wurden. Das wären Erklärungen für die hohen Werte bei der Lebendzählung.

Bei der Gesamtzellzahl kann es zu Fehlern kommen, da nur eine relativ geringe Zellzahl ausgezählt wird und dann hochgerechnet wird. Der statistische Fehler ist sehr groß. Außerdem kann es sein, dass auch hier die Suspensionen nicht genug durchmischt waren.