



Hefewachstum: Erzielung von Einzelkolonien im Ausstrichverfahren ("Vereinzelausstrich") zur Anlegung von Reinstammkulturen oder zur Kontrolle der Reinheit von Hefekulturen

**BrauLabor
13
Einzelkolonien
Ausstrich-
technik
reine
Hefestämme**

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

Einführung

Unter einer Hefereinkultur* versteht man eine homogene* Kultur* von gleichartigen Organismen einer einzigen Hefeart, die frei ist von Mikroorganismen anderer Art (sog. Kontaminanten*). Idealerweise ist eine solche Kultur nur aus einer einzigen Ursprungszelle hervorgegangen sein, so dass man einen Klon* erhält, dessen Einzelorganismen genetisch untereinander (nahezu) identisch sind. Ein einfaches Zweischrittverfahren führt 1. durch Verdünnung und Ausplattierung der Ausgangshefeprobe und 2. durch eine Art mechanische Verdünnung mittel spezieller Ausstrichtechnik zu Einzelkolonien, die mit grosser Wahrscheinlichkeit aus einer einzelnen Zelle oder zumindest aus einem kleinen Zellverband hervorgegangen sind. Daher spricht man statt von "Kolonien" zweckmässiger von **Kolonie bildenden Einheiten***, abgekürzt **KbE**.

*: definierte Begriffe → siehe Info > Glossar Mikrobiologie



Kennen lernen eines einfachen Verfahrens zur Gewinnung von reinen Hefestammkulturen und zur Kontrolle der Reinheit von Hefesuspensionen

Materialien

Glaswaren/Geräte/ andere Materialien	2 Gasbrenner, Impföse, Impfösenhalter (Ersatz: RG-Gestell mit RG), verschliessbares Gefäss für Ethanol zum Flambieren des Drigalskispatels, Waage, Pipetten (PE-Pasteurpipetten, steril; sterile 1.0 und 10.0 mL Messpipetten), evtl. Brutschrank
Verbrauchsmaterial	Zündhölzchen/ Gasanzünder, Kosmetiktüchlein, sterile Petrischalen, wasserfester Faserschreiber
Chemikalien	Ethanol (oder Isopropanol) 70% für Oberflächenentkeimung, Ethanol (Brennsprit), Material zur Hefekultivation: cf. Braulabor 7: Nährmedienrezepte für Hefen und Bakterien, Braulabor 8: Herstellung flüssiger und fester Nährmedien; physiologische Kochsalzlösung 0.9% NaCl, steril oder steriles Nährmedium
Biologische Objekte	Brauhafen-Flüssigkultur (z.B. eingekaufte Hefeflüssigkultur [Wyeast, White Labs, Hefe-Anzuchtkultur aus Trocken-Bierhefe (rehydrierte Hefen), Anstellhefe [Starterkultur] u.a.), gewaschene Ernte-Hefen, Schrägagarkultur/Hefe-Arbeitskultur, isolierte Wildhefen, Hefen im Flaschenbodensatz eines kommerziellen Bieres u.a.

Durchführung

1. Herstellung steriler Nährmedien

1.1. Arbeitsplatz:

Arbeitsplatz "Mikrobiologie-gerecht" einrichten: vgl. Website "Mikrobiologische Aspekte" > Minimaltechnik I sowie 2.5.1. Giessen von Nähragarplatten, Pkt. 1+2

1.2. Nährmedium auswählen:

geeignetes Nährmedienrezept für den gewünschten Mikroorganismus auswählen: siehe [Braulabor 7: Nährmedienrezepte für Hefen und Bakterien](#)

1.3. Nährmedien steril herstellen: [siehe Braulabor 8: Herstellung flüssiger und fester Nährmedien.](#)

2. Verdünnungs- und Ausstrichtechnik

2.1. Hefequellen bzw. Mikroorganismenquellen bereit stellen, z.B.:

- Flüssighefen-Originalkultur (vorzugsweise die im Behälter nach dem Anstellen verbleibenden Rest-Resthefen)
- Reste des eigenen Hefestarters nach dem Anstellen
- Stammkultur im Schrägagarröhrchen
- Gärprobe im Stadium der Hochkräusen*
- selbst aus der Umgebung isolierte Wildhefen
- Bodensatz eines naturtrüben, in der Flasche nachgegorenen kommerziellen Bieres

(Achtung: häufig wird für die Flaschengärung (= Sekundär-gärung) ein anderer Hefestamm verwendet als für die den Biercharakter prägende Hauptgärung!)

2.2. Hefesuspension verdünnen:

Die Hefequelle (*Ausnahme Gärproben) muss zunächst mit sterilem Wasser soweit verdünnt werden, dass eine milchige, starke Trübung entsteht: z.B. 1 mL Ausgangs-hefesuspension + 9 mL steriles Wasser (= 1:10 Verdünnung) - evtl. diesen Schritt mit jeder Verdünnungsstufe mehrfach wiederholen

2.3. Verdünnte Hefesuspension ausplattieren:

- mit einer sterilen PE-Pasteurpipette bzw. sterilen 1.0mL Messpipette ca. 0.1 mL der verdünnten Hefesuspension in die Mitte einer sterilen Malzagarplatte auftropfen
- einen Drigalskispatel entkeimen: gemäss "Minimaltechnik 4: Sterilisation durch trockenen Hitze - Abflammen mit Ethanol (Flambieren)" entkeimen (Details vgl. Abb. 1) und gemäss Abb. 2 die Hefesuspension ausplattieren

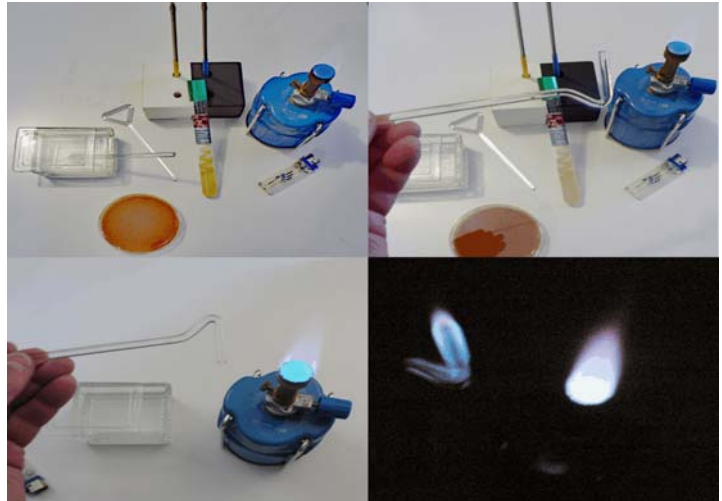


Abb. 1. Flambieren: Abflammen eines Glasspatels (Drigalski-Spatel) mit Ethanol abs.

Oben: Drigalski-Glasspatel zum Verteilen von Hefezellen wird zunächst in einer Wanne in Ethanol abs. (z.B. Brennsprit) eingetaucht; Malzagar-Petrischale und Schrägagarröhrchen mit Hefezellen sowie Impfösen und Gasbrenner sind bereit gestellt. Der mit Ethanol getränkte Drigalskispatel wird in die Nähe der Gasflamme gehalten.

Unten: Der Glasspatel wird kurz durchs Feuer gezogen und fängt so Feuer (Dunkelaufnahme: Gasbrennerflamme ganz rechts und flambierter Glasspatel links). Drigalskispatel während dem Abflammen ständig drehen bis der Alkohol verbrannt ist. Drigalskispatel abkühlen: Deckel der Malzagarplatte leicht anheben, Spatel am Rand auf die sterile Nährbodenoberfläche aufsetzen und abkühlen lassen (vgl. Abb. 2 A).

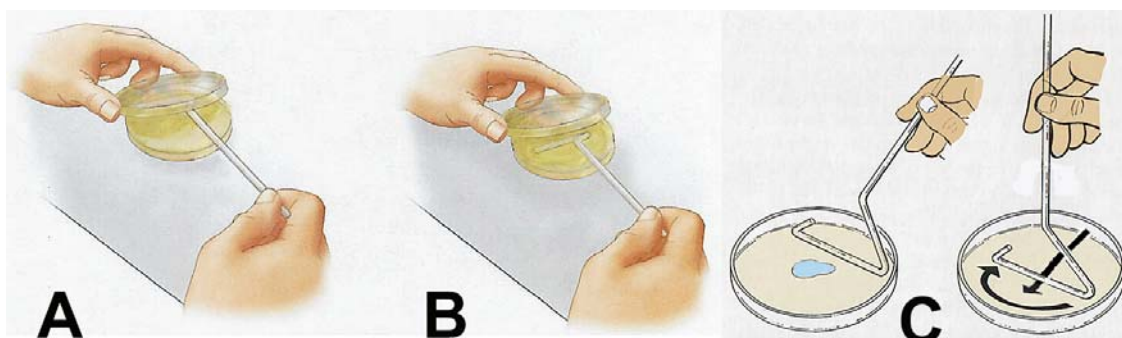


Abb. 2. Ausplattieren einer auf der Malzagaroberfläche eingebrachten Hefesuspension.

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

B: Nach dem Abkühlen wird der Drigalskispatel vom einen Petrischalenrand zur Hefeprobe 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).



2.4. Malzagarplatten beschriften:

Bodenplattenteil der Petrischale am Rand mit mindestens mit Datum, Name des Organismus, Nährmedium und Technik beschriften (z.B. 12.08.2017, WLP 300 Hefeweizen, Malzagar M3, 1:100 Verdünnung)

2.5. Malzagarplatten bebrüten:

Platten mit der Unterseite nach oben entweder bei Zimmertemperatur lichtgeschützt einige Tage stehen lassen, oder - wenn vorhanden - im Brutschrank bei der beim spezifischen Hefestamm empfohlenen Temperatur bebrüten, bis gut sichtbare Kolonien entstanden sind

2.6. Verdünnungsausstrich zum Isolieren von Einzelkolonien: cf. Abb. 3 und 4

- wiederum Arbeitsplatz gemäss Pkt. 1.1. einrichten
- Impföse ausglühen und kurz an der Luft zwischen beiden brennenden Gasbrennern abkühlen lassen (oder: vgl. Abb. 5B)
- eine einzeln stehende Kolonie der bebrüteten Malzplatte mit der Impföse aufnehmen
- in einer sterilen physiologischen Kochsalzlösung oder Bierwürde/Malzmedium (= Verdünnungsmedien) wird die isolierte Kolonie sehr sorgfältig verrieben (z.B. mit entkeimtem Glasstab, Impföse, durch starkes Schütteln → keine Zellklumpen mehr!)
- *allg. Hinweise:*
im folgenden Verdünnungsausstrichverfahren wird die Impföse wie ein Schreibstift geführt und gehalten
der Deckel der Petrischale wird beim Ausstrich schützend über die Bodenplatte gehalten, während die äusseren Finger den Boden der Platte halten (Abb. 5A)
beim Ausstrich durch den Agar darauf achten, dass an die Impföse in einem möglichst flachen Winkel und ohne Druck über den Agar bewegt, also ein "Pflügen" durch den Agar verhindert
- von dieser homogenen Hefezellsuspension wird nun ein erster sog. Verdünnungsausstrich auf Malzagarplatten durchgeführt: Strich I (cf. Abb. 4)
- Impföse wieder abflammen, kurz abkühlen und nach Drehen der Petrischale am Ende von Strich I den Strich 2 führen; dann weitere Striche durch den jeweils voran gegangenen Strich ausführen

Ausstrichmöglichkeiten: dabei gibt es mehrere Ausstrichmöglichkeiten: cf. Abb. 4.

- **Kreuzausstrich:** → geeignet zur Gewinnung von Einzelkolonien. Strich I aus Hefemischpopulation (Abb. 4A)
- **Drei-Strich-Ausstrich:** → geeignet zur Gewinnung von Einzelkolonien aus Mischpopulation (d.h. aus verunreinigten Populationen); daher auch als **Reinigungsausstrich** bezeichnet (Abb. 4B)
- **Hinweis:**
 zur Erleichterung der Führung der einzelnen Striche kann auf der Bodenplatte der Petrischale die Richtung der einzelnen Striche mit einem Faserschreiber vorgezeichnet werden (cf. Abb. 6)
 zur rascheren und sicheren Abkühlung der heissen Impföse kann jeweils nach dem Abflammen immer etwa an der gleichen Stelle in den Agar eingestochen werden (cf. Abb. 5B).

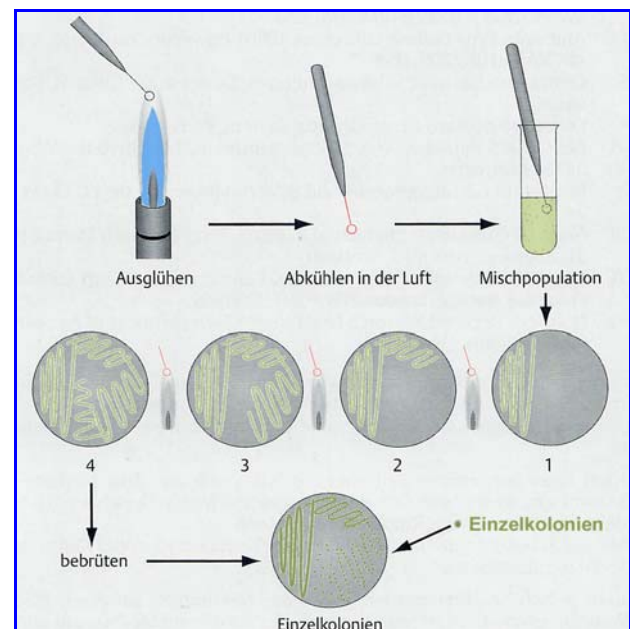


Abb. 3. Verdünnungsausstrich zum Isolieren von Einzelkolonien. Von der verdünnten reinen oder Mischpopulation (Hefe + verunreinigende Mikroorganismen) wird zuerst Strich I ausgeführt. Dann wird wieder abgeflammt, abgekühlt und am Rand durch Strich I der Strich 2 gezogen; dann wieder abgeflammt etc. bis zum Strich 4.

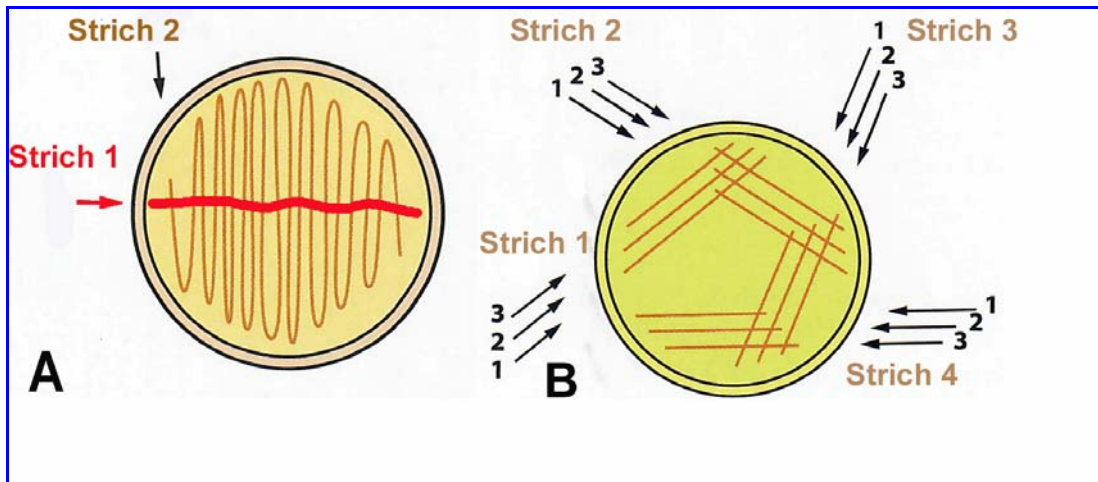


Abb. 4. Ausstrichtechniken. **A:** Kreuzausstrich zur Gewinnung von Einzelkolonien. **B:** Vier-Strich-Ausstrich zur Reinigung von Mischpopulationen, auch zur Erzielung von Einzelkolonien.

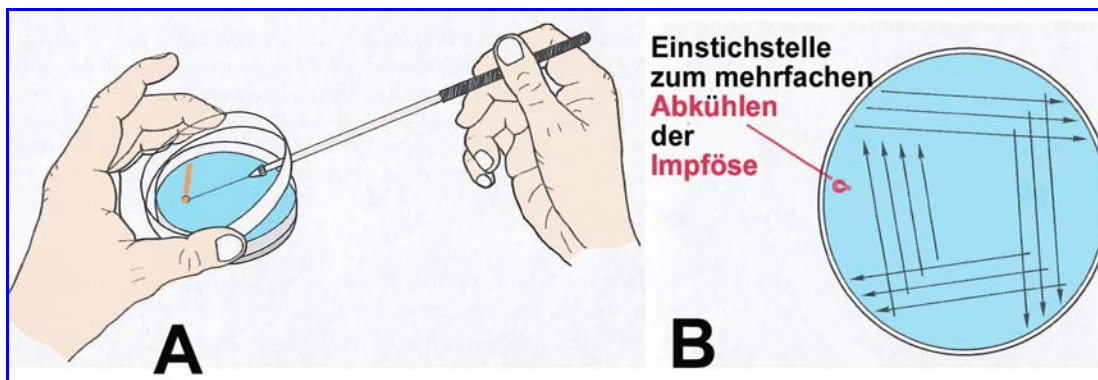


Abb. 5. Hinweise zur Technik "Erzielen von Einzelkolonien".

A: Korrektes Anheben des Deckels der Petrischale während der Strichführung.

B: Zum raschen Abkühlen der ausgeglühten Impföse immer an der gleichen Stelle in den Agar stechen (→ kurzes Zischen!) → Ergebnis: cf. Abb. 7.

2.7. Malzagarplatten beschriften:

Bodenplattenteil der Petrischale am Rand mit mindestens mit Datum, Name des Organismus, Nährmedium und Technik beschriften (z.B. 12.08.2017, WLP 300 Hefeweizen, Malzagar M3, Kreuzausstrich)

2.8. Malzagarplatten bebrüten:

Platten mit der Unterseite nach oben entweder bei Zimmertemperatur lichtgeschützt einige Tage stehen lassen, oder - wenn vorhanden - im Brutschrank bei der beim spezifischen Hefestamm empfohlenen Temperatur bebrüten, bis gut sichtbare Kolonien entstanden sind

2.9. Weitere Verarbeitung der Einzelkolonien:

- Kontrolle auf Stammreinheit: siehe → *"Braulabor 16: Kontrolle der Stammreinheit"*

- Anlegen einer Hefe-Stammkultur im Schrägagarröhrchen: siehe → *"Braulabor 14: Hefe-Stammkulturen auf Schrägagar"*

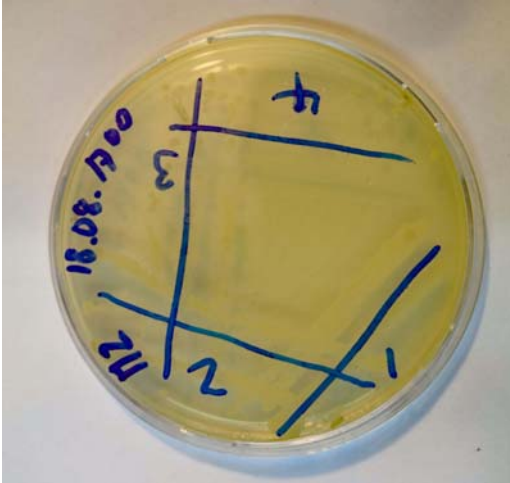


Abb. 6. Zur Erleichterung der Strichführung mit der Hefe-beladenen Impföse wird auf dem Bodenteil der Petrischale der Verlauf der Striche mit einem Faserschreiber markiert (hier 4-Strich-Technik).



Abb. 7. Resultat der Ausstrichtechnik zur Erzielung von Einzelkolonien.

Links: Hefeausstrich auf Malz-Festmedium M3. Rechts: Hefeausstrich auf Universal-Bier-Agar (Rezept 6).

*Überall dort, wo eine einzelne Kolonie vorliegt (Strich 3 und 4), kann eine einzelne Kolonie mit der Impföse abgekratzt und auf einen Schrägagar übertragen werden
—> Reinkultur.*

Video: [Vereinzlungsausstrich](#) [Single Colony](#) (engl.) **Info:** [Info allg.](#)

© K. Frischknecht kfrisch@rsnweb.ch v2 21.08.2017