



## Hefewachstum: Kultivierung von Hefen (und Bakterien) auf festen Nährmedien

z.B. zum Anlegen von Reinstammkulturen und Arbeitskulturen, zur Reinheitskontrolle

**BrauLabor  
10  
Kultivierung**

**auf festen  
Nährmedien**

<b>Aufwand:</b> mittel	<b>Material:</b> mittel	<b>Zeit:</b> mittel	<b>Experimenttyp:</b> Wachstum	<b>Anspruch:</b> einfach
---------------------------	----------------------------	------------------------	-----------------------------------	-----------------------------

### Einführung

Die Anzucht und die Herführung der Hefen\* erfolgt immer in einer Flüssigkultur\* (= Hefensuspension). Auch eingekaufte kommerzielle Bierhefen werden häufig als Flüssigkultur geliefert. Diese Kulturen\* werden meistens für die Beimpfung eines frisch gekochten und abgekühlten Suds\* (= Anstellwürze\*) eingesetzt. Diese Hefestämme\* kann man aber auch "dauerhafter" nutzen, indem man sie auf festen Nährmedien\* weiter züchtet und dann z.B. als Arbeitskulturr\* oder reine Stammkulturen\* verwerten kann. Dies ist mit der Zeit nicht nur kostengünstiger (gilt nur für kommerzielle Flüssigkulturen - Trockenhefen sind i.d.R. preisgünstig), sondern macht auch mehr Spass, wenn man seine "eigenen" selbstgezüchteten Hefen einsetzen kann.

\*:definierte Begriffe -> siehe Info > Glossar Mikrobiologie



Erlernung der sicheren Weiterzüchtung von "Flüssighefen" rep. Hefensuspensionen, allgemein von Mikroorganismen aus Flüssigkulturen auf festen Nährmedien (z.B. Schrägagarkulturen, Petrischalenkulturen).

### Materialien

Glaswaren/Geräte/ andere Materialien	2 Gasbrenner, Impföse, Impfösenalter (Ersatz: RG-Gestell mit RG), 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	Brauhefen-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

#### I. Herstellung steriler Nährmedien

##### I.1. Arbeitsplatz:

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



##### I.2. Nährmedium auswählen:

geeignetes Nährmedienrezept für den gewünschten Mikroorganismus auswählen: Vorgehen siehe "Braulabor 7: Nährmedienrezepte für Hefen und Bakterien" bzw. Kurzzusammenfassung der Nährmedienrezepte S. 2 "Nährmedien-Grundrezepte"

Abb. 1. Der mikrobiologische Arbeitsplatz mit gut abwischbarer Oberfläche (z.B. Plättli/Fliesen), Gasbrenner (optimal 2 Brenner: Luft steigt hoch und hält Luftkeime fern), Desinfektionsmittel (z.B. 70% Ethanol oder Isopropanol, Sterillium), Impfösen, Petrischalen, Erlenmyerkolben mit Hefensuspension (bzw. EMK mit heissem giessfähigem Nährmedienagar).

# Nährmedien - Grundrezepte fest + flüssig

## Malzmedien für Hefen

### Malz-Festmedium SA-Kultur\*:

**M1:** 3.36 g Malzextrakt-Agar [ROTH X923.1](#)  
1.3 g Maltose  
0.25 g  $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$  oder 0.1 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.1 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$   
ad 100 mL Wasser<sub>dem.</sub>, pH  $4.7 \pm 0.2$

**M2:** 4.0 g Malzextrakt standard [ROTH X976.1](#)  
1.3 g Maltose  
0.25 g  $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$  oder 0.1 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  + 0.1 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$   
1.5 g Agar-Agar  
ad 100 mL Wasser<sub>dem.</sub>, pH  $4.7 \pm 0.2$

### Malz-Anzuchtmedium für SA\*:

**M3:** 1.9 g Malzextrakt-Bouillon [ROTH CP75.1](#)  
evtl. Zusatz an Hefenährsalze bzw. Hefenahrung  
(je  $<0.1$  g/100 mL), pH  $4.7 \pm 0.2$   
ad 100 mL Wasser<sub>dem.</sub>

### Startermedium für Würze:

**M4:** Malzextrakt [ROTH X976.1](#) OG 1.040  
1.0 g Wyeast Hefe Nutrient blend  
1/10 Pellet Hopfen (oder 1 Tr. Hopfenextrakt)

## Nährmedien für Bakterien

### Nährfestmedium (Nähragar):

**M5:** 1.1 g Nährbouillon [ROTHX929.1](#)  
1.7 g Agar-Agar  
ad 100 mL Wasser<sub>dem.</sub>

### Nährlösung (Nährbouillon):

**M6:** 1.1 g Nährbouillon [ROTHX929.1](#)  
ad 100 mL Wasser<sub>dem.</sub>

### MRS-Bouillon für Lactobazillen

**M7: Rezept 1:** Pepton (10 g/L), Hefeextrakt (4), Rindfleischextrakt (8), Glucose (20), Dikaliumphosphat (2), Natriumacetat (5), Ammoniumcitrat (2), Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4$ ) (0.2), Mangansulfat (0.05), Tween 80 (1), pH-Wert 6.2

**M8: Rezept 2:** 5.2 g MRS-Bouillon [ROTHHP64.1](#) ad 100m mL Wasser<sub>dem.</sub>

### MRS-Agar für Lactobazillen

**M9:** 5.2 g MRS-Bouillon [ROTHHP64.1](#)  
1.7 g Agar-Agar ad 100 mL Wasser<sub>dem.</sub>

**Wichtige Hinweise:** \*malzhaltige Medien max. **nur 15min** autoklavieren.

Anstelle der teureren ROTH-Nährmedien kann auch einfach Trockenmalzextrakt-pulver verwendet werden ([Bsp.](#))



#### Literatur:

[www.maltosefalcons.com/tech/yeast-propagation-and-maintenance-principles-and-practices](http://www.maltosefalcons.com/tech/yeast-propagation-and-maintenance-principles-and-practices) 14.09.2015  
STEINBÜCHEL, A. et al. (2013). Mikrobiologisches Praktikum. Berlin: Springer  
ROTH AG (2015). Katalog: Mikrobiologie-Trockennährmedien, S. 1267, 1872.

### 1.3. Nährmedien steril herstellen:

Das genaue Vorgehen ist beschrieben unter "Braulabor 8: Herstellung flüssiger und fester Nährmedien" > "Giessen von Nähragarplatten" und "Giessen von Schrägagarröhrchen zur Hefestammhaltung (Schrägagarkulturen)"

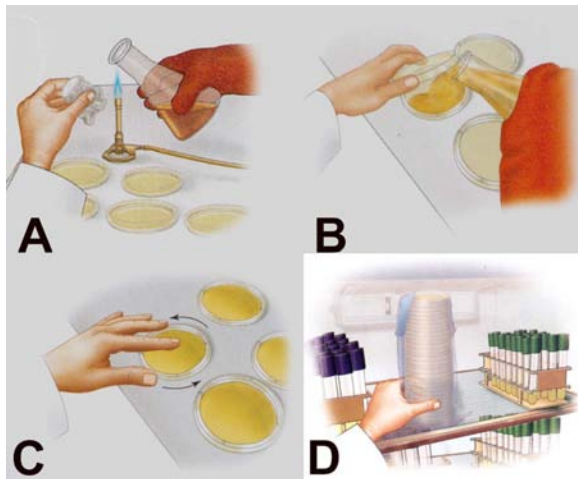


Abb. 2. Feste Nährmedien herstellen.

Nach der Auswahl und Herstellung steriler Nährmedien im Schnellkochtopf wird der noch heisse Nähragar gegossen: genauer Beschrieb unter "Mikrobiologisches Braulabor I > Braulabor 8 > Giessen von Nähragar.

- die gegossene Petrischalen noch im heiss-warmen Zustand übereinander stapeln (--> resultiert in deutlich weniger störendem Wasserdampf im Petrischalendeckel)
- wenn frisch gegossene Nährmedien (Petrischalen, Schrägagar) nicht sofort weiter verarbeitet werden, müssen sie im Kühlschrank aufbewahrt werden
- Vor dem Beimpfen kalte Nährmedien auf Zimmertemperatur bringen. Störende Kondenswassertropfen im Petrischalendeckel möglichst keim-arm entfernen: z.B. aus einer Kosmetiktuschachtel die obersten 2 Tüchlein wegzupfen, 3. Tüchlein entnehmen, mit Isopropanol 65%ig leicht besprühen und nach ca. 30 sec Deckel der Petrischale innen trocken reiben. Wichtig: immer in der Nähe bei mindestens einem brennenden Gasbrenner arbeiten, damit Luftkeiminfektionen möglichst gering bleiben!

## 2. Beimpfen der sterilen festen Nährmedien:

bei allen beschriebenen Verfahren immer wenn möglich zwischen zwei brennenden Gasbrennern arbeiten - keine brennbaren Flüssigkeiten in der Nähe aufbewahren, evtl. Haare nach hinten bilden, Vorsicht mit den Ellbogen bzw. Kleidern beim Arbeiten !!

### 2.1. Beimpfung Schrägagarröhrchen:

- Gefäss mit Hefesuspension abflammen (Abb. 2 A), bzw. Hefebeutel mit Desinfektionsmittel entkeimen (cf. Abb. 6)
- Impföse in der Gasflamme abflammen (cf. Abb. 3)
- Impföse sofort nach dem Erkalten in Hefesuspension eintauchen und langsam wieder heraus ziehen --> Öse sollte nun mit Hefesuspension gefüllt sein (Abb. 4, falls nicht: Öse mit Beisszange etwas flacher drücken)

- Schrägagarröhrchen (SA):
  - ▶ Alukappe bzw. Schraubverschlusskappe abnehmen und mit der Öffnung nach unten in Alkohollache (70% Ethanol bzw. Isopropanol) in einem kleinen Gefäss platzieren (--> bleibt so keimfrei!)
  - ▶ Mündung des SA abflammen
- auf der schrägen Nähragaroberfläche des SA mit der Impföse ganz sanft und ohne Druck die Hefen in S-Linien ausstreichen slalomförmig abstreifen (Abb. 5)
- SA nochmals abflammen und Röhrchen wieder verschliessen
- ebenso Impföse wie oben beschrieben aus glühen und im Halter ablegen



Abb. 4. Impföse muss mit Hefesuspension sichtbar gefüllt sein.



Abb. 3. Abflammen der Impföse.

Impföse steil in die Gasflamme hinein halten und warten, bis der Draht glüht. Falls der Schaft auch aus Metall ist, den unteren Teil ebenfalls durch die Flamme ziehen.



Abb. 5. Beimpfung des Schrägagars in slalomähnlichen S-Linien, ohne Druck, nur sanftes Gleiten.

- **Beschriftung:** frischbeimpfte Schrägagarröhrchen wie üblich beschriften: mindestens mit Datum, Name des Organismus inkl. SA-Medium (z.B. 09.10.2017, WLP 300 Hefeweizen, Malzagar M3; cf. auch Abb. 9)





### - Bebrüten:

z.B. zunächst bei Raumtemperatur, lichtgeschützt, oder besser im Brutschrank bei suboptimaler Organismus-Temperatur, bis eine geringe Organismenmasse sichtbar ist (z.B. bei Wyeast Weihenstephan Weizen 3068: 19°C)

### - Aufbewahrung:

nach dem Anwachsen zur Vermeidung von raschem Austrocknen mit Plastikklebeband (oder Parafilm, sterilem Gummistopfen u.ä.) verschliessen und bei leicht höherer Temperatur 2-3 Tage wachsen lassen (z.B. Weihenstephanhefe: zwischen 20-21°C). Anschliessend Lagerung in der Regel dunkel und im Kühlschrank (< 4°C).

## 2.2. Beimpfung Malzagarplatte (zwischen brennenden Gasbrennern):

- Anzuchtgefäss mit Hefesuspension abflammen, bzw. geschwollenen Hefbeutel mit Desinfektionsmittel entkeimen (Abb. 6)
- Impföse in der Gasflamme abflammen (Abb. 3)
- Impföse sofort nach dem Erkalten in Hefesuspension eintauchen und langsam wieder heraus ziehen → Öse sollte nun mit Hefesuspension gefüllt sein (Abb. 4; falls nicht: Öse mit Beisszange etwas flacher drücken)
- Deckel der Petrischale mit der einen Hand leicht schräg abheben (nicht ablegen → Kontaminationsgefahr!) (Abb. 7)

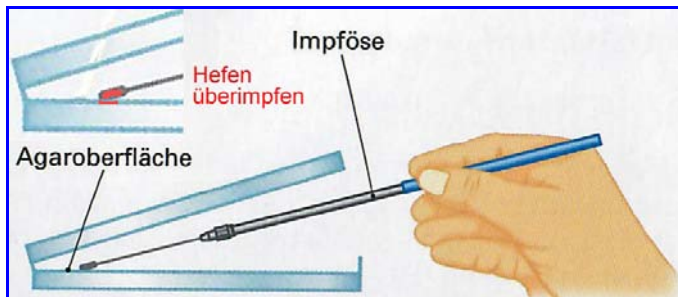


Abb. 7. Beimpfung des Malzagars.

Petrischalendeckel leicht anheben und Hefen-beladene Impföse in diesem schrägen Winkel ganz leicht über die Agaroberfläche streifen gemäss Impfstriche Abb. 8A oder 8B.

- mit der anderen Hand die Impföse
  - ▶ in grossen Schleifen ganz sanft und ohne Druck über die gesamte Oberfläche des Malzagars im Bodenteil der Petrischale ziehen (eher gleiten lassen, Abb. 8A), oder
  - ▶ Ausstrichweise der "Einzelkolonietechnik" (z.B. 8B, Details siehe unter "Braulabor 13: Erzielung einer Einzelkolonie im Ausstrichverfahren")
- Petrischale wieder schliessen

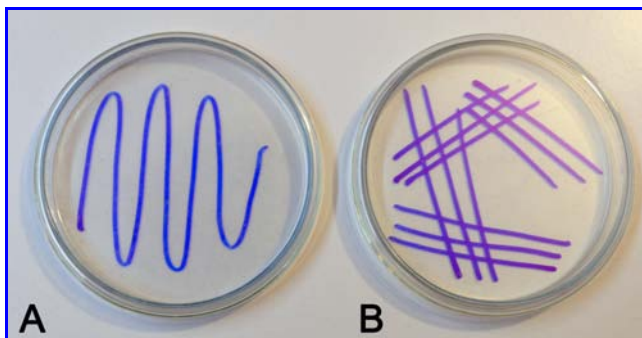


Abb. 8. Mögliche Impfstriche auf Malzagnährboden.

A: Einfacher Schleifenausstrich. B: Ausstrichtechnik in Anlehnung an die Braulabor 13 - "Einzelkolonietechnik" > Abb. 4.



Abb. 6. Desinfektion des Hefebutels (Wyeast Smack Pack). Vorgängig natürlich: SmackPack aktivieren: [Info](#) (engl.), [Info](#) (deutsch), [Video](#).

Mit einem Desinfektionsmittel (hier: Isopropanol 65%) sowohl Beutelrand als auch Schere einsprühen und erst nach der Einwirkungszeit Beutel offen schneiden und Hefen entnehmen.



### - Malzagarplatten beschriften:

Bodenplattenteil der Petrischale am Rand mindestens mit Datum, Name des Organismus und Nährmedium beschriften (z.B. 09.10.2017, WLP 300 Hefeweizen, Malzagar M3)

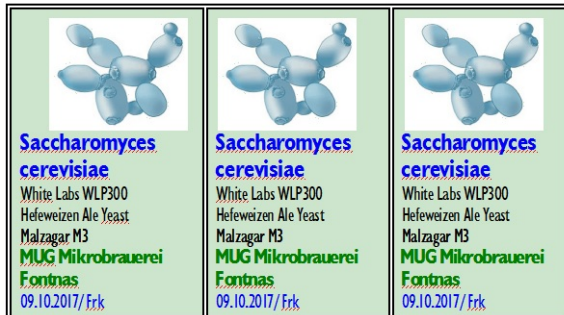


Abb. 9. Beschriftung von Hefekulturen.

Informationen können vereinfacht direkt am Rand der Bodenplatte\* mit wasserfestem Faserschreiber notiert werden (vereinfacht: WLP300, 09.10.17, M3) oder ausführlicher auf Etikette für die Schrägagarkulturröhrchen).

\*Hinweis: wenn Petrischalendeckel können verwechselt werden (falsch aufgesetzt), nicht aber der Bodenplattenteil mit den gewachsenen Organismen!

### - Malzagarplatten bebrüten:

Platten mit der Bodenunterseite nach oben

- ▶ entweder bei Zimmertemperatur lichtlichtgeschützt einige Tage stehen lassen,
- ▶ oder - wenn vorhanden - im Brutschrank bei der beim spezifischen Hefestamm empfohlenen Temperatur bebrüten, bis gut sichtbare Kolonien entstanden sind

### - Aufbewahrung:

nach dem Anwachsen zur Vermeidung von raschem Austrocknen mit Plastikklebeband (oder Parafilm u.ä.) Übergang zwischen Petrischalendeckel und Bodenplatte rundum verschliessen und bei leicht höherer Temperatur 2-3 Tage wachsen lassen (z.B. Weihenstephanhefe: zwischen 20-21°C).

Anschließend bewachsene Platten mit Bodenteil nach oben, in einen Plastikbeutel eingeschlossen dunkel und im Kühlschrank (< 4°C) lagern. Lagerzeit: 4 Wochen bis maximal 1 Jahr, periodisch kontrollieren und evtl. früher wieder auf frische Malzagarplatten überimpfen