



Kontrolle der Stammreinheit Sind meine Reinzuchthefen noch frei von anderen Mikroorganismen? Überprüfung durch lichtmikroskopische Beobachtung und Einzelkolonietechnik

**BraLabor
16
Kontrolle der
Stammreinheit
reine
Hefestämme**

Aufwand: mittel	Material: mittel	Zeit: mittel	Experimenttyp: Beobachtung, Koloniewachstum	Anspruch: mittel
---------------------------	----------------------------	------------------------	---	----------------------------

Einführung

Reine Hefestämme bzw. Reinzuchthefen* sind das Ziel eines jeden ambitionierten Heimbrauers, der seine eigenen Hefen züchtet und z.B. als Reinstammkulturen* auf Schrägagar* oder sogar als Kryokulturen* aufbewahrt. Denn nur reinrassige Hefen, die nicht von einer Fremdflora begleitet wird, garantieren jederzeit reproduzierbare gleichbleibende Qualität, insbesondere bezüglich des Geschmacks. Reinzuchthefen bedeuten, dass alle Nachkommen letztlich aus einer gemeinsamen "Ursprungshefe" stammen mit genau dem identischen genetischen Potenzial. Fremde Hefen, insbesondere undefinierte Wildhefen und Bakterien dürfen sich nicht mit diesen reinen Hefestämmen das gemeinsame "Futter" der Anstellwürze teilen! Wie aber kann man nun auf einfache Weise grob, ohne aufwändigen Stoffwechsel*- oder DNA*-Analysen sicher stellen, dass es sich um einen reinen, nicht kontaminierten Stamm handelt?

*: definierte Begriffe → siehe Info > Glossar [Mikrobiologie A - M](#) und Glossar [Mikrobiologie N - Z](#)



Zwei einfache Techniken sollen sicher stellen, dass eigene Reinzuchthefestämme nicht kontaminiert sind: 1. durch eine lichtmikroskopische Beobachtung können bakterielle Infektionen erkannt werden, und 2. durch eine Einzelkolonietechnik können fremde eingeschlichene Hefen an der Koloniemorphologie im Vergleich zum "sicheren" Hefestamm u.U. erkannt werden. Beide Verfahren zusammen lassen eine Bewertung zu.

Materialien

Glaswaren/Geräte/ andere Materialien	Lichtmikroskop inkl. Zubehör, Präpariernadel/ Lanzett-nadel, Pinzette, Glasstab Impföse, Gasbrenner
Verbrauchsmaterial	Wasser, Linsoft (Kosmetiktüchlein), Objektträger (OT), Deckgläser (DG), Pasteurpipetten, wasserfeste Faserschreiber, evtl. Linsenreinigungstüchlein, Zündhölzchen/Feueranzünder
Chemikalien	Wasser, evtl. physiologische Kochsalzlösung 0.9% NaCl,
Biologische Objekte	zu untersuchender Reinzuchthefestamm (Schrägagarröhrchen)

Durchführung

1. Lichtmikroskopische Beobachtung

1.1. Arbeitsplatz:

Zunächst wird der Arbeitsplatz für die lichtmikroskopische Untersuchung der Hefeprobe eingerichtet: siehe "Braulabor 1: Lichtmikroskop - eine allgemeine Einführung in die Mikroskopie", S. 8. sowie für grundlegende mikrobielles Arbeiten (siehe "Handlingstipps - Nr. 2 Einrichten eines mikrobiologischen Arbeitsplatzes")

Minimumsinventar: Lichtmikroskop, Objektträger (OT), Deckgläser (DG), Glasstab, Pasteurpipette, Präpariernadel, Kosmetiktüchlein, Spritzflasche mit Wasser. Mikrobiologie: Gasbrenner (optimal 2, Impföse, keimarme Arbeitsfläche, Desinfektionsmittel (z.B. 70% Ethanol oder Isopropanol in Spritzflasche)





1.2. Objektträger vorbereiten:

Ein Objektträger wird angehaucht und in zwischen Daumen und Zeigefinger eingeklemmtem Kosmetiktüchlein vorsichtig durchgezogen → Kontrolle durch Blick gegen das Licht: Objektträger muss optisch klar und faserfrei sein

1.3. Wassertropfen aufbringen:

Mit einem Glasstab oder einer Pasteurpipette einen kleinen (!) Wassertropfen in der Mitte des OT auftragen

1.4. Hefe einbringen:

- Schrägagarröhrchen bzw. Hefekulturgefäss (Petrischale, Erlenmeyerkolben) öffnen, je nach Kulturgefäss im Gasbrenner abflammen
- mit einer entkeimten Lanzettadel bzw. Präpariernadel ganz wenig Hefe aus der Hefekultur in den Wassertropfen einbringen und mit kreisenden Bewegungen auf möglichst kleiner Fläche verteilen (Fläche < als Deckglas; Abb. 1a)

1.5. Deckglas luftblasenfrei auflegen:

Mit Hilfe einer Pinzette wird ein Deckglas (DG) luftblasenfrei (!!) aufgelegt: DG vorsichtig mit Pinzette festhalten, von links an den Tropfen mit der Hefeaufschwemmung heranfahren, bis sich diese wässrige Lösung kapillar an den DG-Rand heranzieht, dann das DG langsam absenken (vgl. Abb. 1b)

1.6. Mikroskopieren im Hellfeld:

Gemäss der Anleitung Braulabor I oder 2: "Korrektes Mikroskopieren" Hefezellen beobachten:

- verschiedene Vergrößerungen wählen (Objektive von klein [z.B. 4fach] bis gross [z.B. 60fach] einschwenken)
- jeweils mit Lichtstärke (Helligkeitsregler) und Aperturblendenhebel (= Iris- oder Kondensorblendenhebel) "spielen", bis optimale Schärfe bei angenehmer Helligkeit erreicht wird

Hinweis: falls die Hefesuspension zu dicht ist, kann durch Zugabe eines Wassertropfens seitlich des linken Deckglasrandes und "Hindurchziehen" der Flüssigkeit unter dem Deckglas durch sorgfältiges Heranführen eines kleinen Streifens Kosmetiktüchleins eine gewisse Verdünnung erreicht werden (vgl. Abb. 1c); notfalls eine korrekte Verdünnung der Hefesuspension durch Zugabe von Wasser im Verhältnis von 1:2 bis 1:10 durchführen.

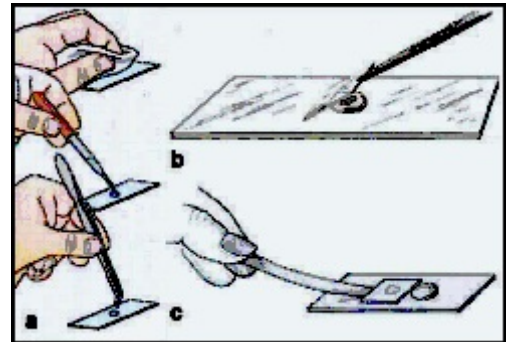


Abb. 1. Allgemeine Präparationstechnik: Anfertigung eines Frischpräparates (Einbetten eines Objektes in Wasser).

a: Säubern des Objektträgers durch z.B. Anhauchen und Abwischen mit faserarmem Gewebe (z.B. Linsenreinigungstüchlein). Einbetten des Objektes ins Wasser: Zufuhr von einem Wassertropfen mit Glasstab oder Pasteurpipette → Wasser bzw. Farbstofflösung verteilt sich kapillar entlang der Deckglaskante.

b: Auflegen des Deckglases mittels Pinzette (langsam an Wassertropfen heranziehen, sehr langsam absenken).

c: Absaugen von überschüssigem Wasser (bzw. Durchsaugen von Reagenzien, z.B. zur Färbung)

[Quelle: KREMER, Mikroskopieren leicht gemacht, mod. 2002].

1.7. Beobachtungen:

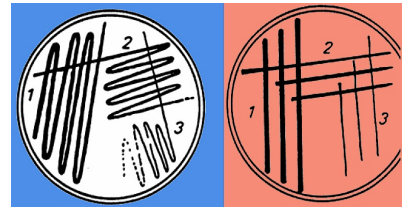
- **Hefezellen:** es sollten nur Hefezellen mit der typischen Hefestruktur sichtbar sein: Einzellzellen oder Mutterzellen mit knospenden Tochterzellen (vgl. z.B. [hier](#))
- **Kontamination** wenn:
 - ▶ **Bakterien/Einzeller:** andere Mikroorganismen erkennbar sind, die i.d.R. deutlich kleiner sind als Hefezellen, z.B. Bakterien (meist längliche Stäbchenstruktur oder Kugelstruktur [Kokken], vgl. Abb. 2 oder Einzeller (cf. [hier](#)))
 - ▶ **Bewegung:** wenn sich kleinere Mikroorganismen deutlich durch das LM-Sichtfeld bewegen - geradlinig, "taumelnd" oder spiralig (cf. z.B. [hier](#))



1.8. Konsequenzen:

Ein kontaminierte Hefestammkultur sollte nicht mehr direkt eingesetzt werden, sondern nach der nächste Schritt sollte das Verfahren nach "Braulabor 13: Erzielung einer Einzelkolonie im Ausstrichverfahren" sein!

2. Überprüfung der möglichen Kontamination durch Einzelkolonietechnik (Vereinzlungs-/ Verdünnungsausstrich)



Kurzinfo zur Technik:

Zur Gewinnung von Einzelkolonien und damit einer Reinkultur von Mikroorganismen wie Hefen oder Bakterien kann auf einer sterilen Nähragarplatte ein fraktionierter Ausstrich gemacht werden, der sog. Vereinzlungsausstrich oder auch Verdünnungsausstrich. Im Verlaufe des Ausstrichs kommt es auf der Oberfläche einer einzigen Agarplatte zur mechanischen Trennung und dadurch Vereinzlung der aufgetragenen Mikroorganismenzellen. Spätestens beim letzten Ausstrich - je nach Strichverfahren (Einzelstriche, Strichserien, geschwungene Striche, 3-4 Striche) bleiben einzelne Zellen mit grossem Abstand voneinander auf der Agaroberfläche liegen. Diese wachsen dann bei der Bebrütung zu sichtbaren Einzelkolonien heran und können morphologisch beurteilt werden.

Durchführung:

2.1. Arbeitsplatz:

Zunächst wird der Arbeitsplatz für das mikrobielles Arbeiten vorbereitet (siehe "Handlingstipps - Nr. 2 Einrichten eines mikrobiologischen Arbeitsplatzes")

2.2. Durchführung "Ausstrichverfahren zur Erzielung von Einzelkolonien"

Diese Technik ist ausführlich beschrieben in "Mikrobiologisches Braulabor I > Braulabor 13: Erzielung einer Einzelkolonie im Ausstrichverfahren"



2.3. Beobachtungen:

Kontrolle der Einzelkulturen (= Reinkulturen?)

► makroskopisch (von blossen Auge oder mit Lupe [10-20fach]):

- **Reinkolonie** = alle Kolonien in Form und Farbe identisch
(zwingend "Braulabor 27: Kolonienmorphologie: Wie kann ich das Aussehen von Kolonien (Hefen, Bakterien, Mikropilze) beschreiben?" zu Hilfe nehmen, vgl. Bsp. 2)
- **Vergleichskolonie**: eine Reinkolonie des untersuchtes Stammes zum Vergleich herbei ziehen

Hinweis: je nach Nährbodentyp, Anzahl verdünnter Hefezellen am Ende des Ausstrichs sowie die Nähe zur nächsten Einzelkolonie (→ Konkurrenz um Nährstoffe!) kann die Grösse der Einzelkolonien variieren! Grösse ist also kein Beurteilungskriterium.

► mikroskopisch (Lichtmikroskop)

Mikroskopisch wird die Reinheit überprüft, indem Material von Kolonien mikroskopiert wird (siehe I. Lichtmikroskopische Beobachtung - mit einer sterilen Präpariernadel/Stecknadel eine kleine Probe aus den Einzelkolonien entnommen und in den Wassertropfen einmisch).

Die Struktur/ Morphologie der

- einzelnen sichtbaren Hefezellen inkl. Knospung wird untereinander auf Übereinstimmung verglichen,

d.h. alle müssen vom gleichen Typ sein (identische Koloniemorphologie bez. z.B. Aussehen, Form, Rand etc.)

- auch im Vergleich zu einer lichtmikroskopischen Probe einer "sicheren" Hefereinkultur sollten die morphologischen Merkmale übereinstimmen.

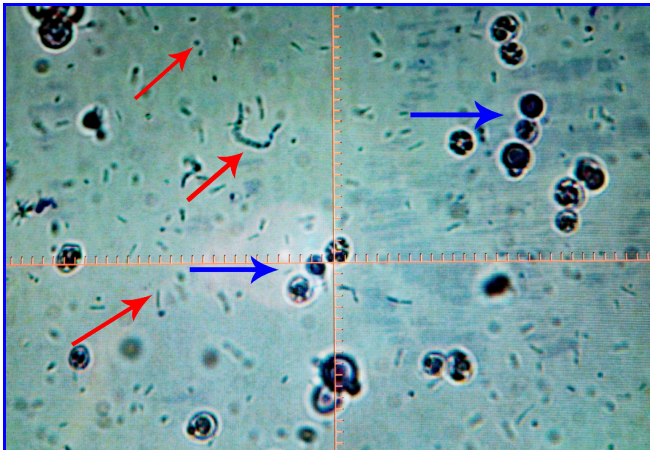


Abb. 2. **Kontaminierte Hefekultur.**

Zwischen den deutlich erkennbaren Hefezellen (blaue Pfeile) sind überall auch Bakterien zu erkennen (rote Pfeile): Stäbchen, Stäbchenketten und Kokken (kugelförmig).

[Vergr.: 600x, Kontrastmittel: Methylenblau].

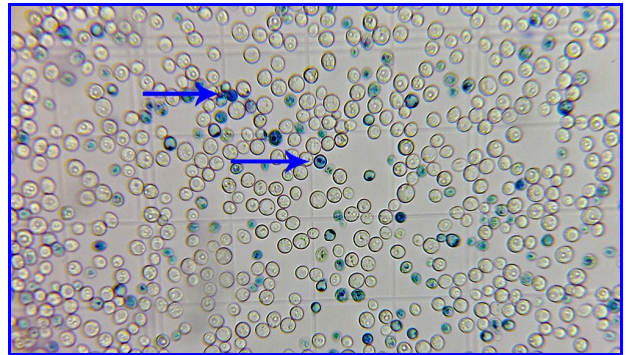


Abb. 3. Reinstamm-Hefekultur.

Es sind nur Hefezellen zu erkennen. Blau angefärbte Hefezellen (blaue Pfeile) sind mit Methylenblau angefärbt und zeigen mittels dieses gleichzeitigen Viabilitätstests tote Zellen an (= deutlich blau gefärbt), während lebende (viable, vitale) Hefezellen ungefärbt und prall-rundlich sind.

cf. Braulabor 4 - Viabilitätstest

[Quelle: [hier](#)]

Info: z.B. Bilder von Hefe-Kontaminationen: [hier](#) und [hier](#).