

## Substratverwertung bei Hefen



### 1. Einleitung

Dieses Material ist für die Jahrgänge der oberen Mittelstufe und der Oberstufe geeignet und ermöglicht Untersuchungen zur Ernährung, des Energiestoffwechsels und zum genetischen Programm von Hefen.

Lieferumfang:

- 6 Trägerplatten zur Versuchsdurchführung (bei 4°C aufbewahren)
- 6 Röhrchen mit Fertigmilieu zur direkten Verwendung 4°C
- 6 Inkubationskammern für die Trägerplatten
- 12 Tropfpipetten

Benötigtes Zubehör:

- frische Hefe, Trockenhefe, Hefestamm, siehe nationale Sammlung der Pasteur-Universität
- physiologische Kochsalzlösung
- destilliertes Wasser

Empfohlenes Zubehör:

- Zentrifuge (z.B. [201.5197](#))
- Magnetrührer (z.B. [201.5158](#))
- Brutschrank (z.B. [201.3675](#))

Auch ist ein Ergänzungsmodul verfügbar (1 Trägerplatte + 1 gebrauchsfertiges Röhrchen mit Milieu für den Stoffwechsel + 1 Inkubationskammer für die Trägerplatte + 2 Tropfpipetten).

## 2. Vorbereitungen

### 2.1 Vorbereitung der Hefen

Am Vorabend des Versuchs wird eine Hefensuspension aus frischer Hefe (50g pro Liter) oder Trockenhefe (14g pro Liter) in Kochsalzlösung (NaCl zu 9 g/l) hergestellt.

Am Tag der Versuchsdurchführung erfolgt die Zentrifugation der Hefen mit anschließender Resuspension des Pellets in 100 ml Kochsalzlösung. Diese Arbeitsschritte dienen dazu, die Zellmembran der Hefen zu "waschen" und tragen somit zur Verbesserung ihrer Reaktionsfähigkeit bei.

Während des Experimentes sollte durchgängig gerührt werden (Magnetrührer). Mit Hilfe einer Pasteur-Pipette wird eine Probe entnommen, 3 Tropfen dieser Probe in 2 ml Kochsalzlösung gegeben und invertiert.

### 2.2 Vorbereitung der Trägerplatte

Einige Stunden vor der Versuchsdurchführung wird die Trägerplatte aus dem Kühlschrank genommen. Nicht schütteln. Boden und Deckel einer Inkubationsbox werden zusammengefügt und 5 ml destilliertes Wasser zu den Hefen um eine feuchte Atmosphäre zu schaffen; ein Verweis auf den Stamm wird an die seitliche Lasche der Box geschrieben. Nach dem Auspacken wird die Trägerplatte in die Inkubationsbox gestellt.

### 2.3 Beimpfung der Trägerplatte

Es werden hier 3 Tropfen der Hefesuspension in das Milieu der Trägerplatte eingebracht (Medium ist in einer Ampulle vorhanden). Dabei sollte eine Homogenisierung mittels Auf- und Abpipettieren erfolgen, wobei jedoch eine Blasenbildung zu vermeiden ist. Das Befüllungsniveau sollte horizontal oder leicht konvex sein, jedoch nie konkav, da eine zu geringe oder übermäßige Befüllung der Reaktionsgefäße zu ungenauen oder falschen Ergebnissen führen kann. Inkubationsbox schließen und Inkubation bei 30°C im Brutschrank.



## 2.4 Auswerten der Trägerplatte

Beobachten Sie das Wachstum der Hefen nach 24 bis 48 Stunden Inkubation, eventuell auch 72 Stunden (falls der Glukose-Test nach 48 Stunden nicht ausreichend deutlich ist) Vertiefung 0 dient hierbei als Negativprobe. Ein Reaktionsraum, der trüber ist als der Vergleichsprobe, zeigt eine positive Reaktion an (Vermerk auf den Protokollblättern).

*Anmerkung:*

Die Auswertung des Experimentes kann auch nach 4 Tagen (statt 72 Stunden) vorgenommen werden, allerdings ist es dann nötig den Deckel der Platten lediglich bei der Betrachtung abzunehmen um eine Kontamination zu vermeiden.

## 2.5 Entsorgung

Nach Verwendung müssen Ampullen, Boxen, Pipetten und Trägerplatten in Chlorbleiche (Eau de Javel) vor der Entsorgung getaucht werden.

## 2.6 Aufbewahrung

Im Kühlschrank (2-8°C) bis zum Verfallsdatum.

## 4. Pädagogische Anwendung

Die Trägerplatte hat 20 Reaktionsräume und 20 Mikro-Reagenzgläser, die dehydrierte Substrate enthalten. Die folgenden 20 Tests lassen sich damit durchführen:

GLU	GLUcose	SOR	SORbitol
GLY	GLYcerol	MDG	α-Methyl-D-Glucoside
2KG	2 -Ceto-D-Gluconat	NAG	N-Acetyl-D-Glucosamine
ARA	L-ARAbinose	CEL	CELLobiose
XYL	D-XYLose	LAC	LACTose
ADO	ADONitol	MAL	MALtose
XLT	XyLiToI	SAC	SACcharose
GAL	GALactose	TRE	TREhalose
INO	INOsitol	MLZ	MeLeZitose
RAF	RAFfinose		

- 1 Vergleichsprobe

Alle Reagenzgläser werden mit einem halbfesten Minimal-Medium beimpft, da Hefen nur wachsen können wenn entsprechendes Nährmedium mit Substraten vorhanden ist Das Reagenzglas welches die Referenz enthält bleibt ohne Substrat. Dieser Versuch ist dazu geeignet, die Substrate zu bestimmen, die von einen Hefenstamm umgesetzt werden können.

Der Versuch kann beispielsweise mit *Schizosaccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe) durchgeführt werden. Es kann auch die Stoffwechselleistung zweier unterschiedlicher

Hefestämmen verglichen werden, z.B. *Schizosaccharomyces cerevisiae* und *Rhodotorula rubra*

## 5. Ergebnisse

Beobachten Sie das Wachstum der Hefen nach 24 bis 48 Stunden Inkubation, eventuell auch 72 Stunden (falls der Glukose-Test nach 48 Stunden nicht ausreichend deutlich ist) Vertiefung 0 dient hierbei als Negativprobe. Ein Reaktionsraum, der trüber ist als der der Vergleichsprobe, zeigt eine positive Reaktion an (Vermerk auf den Protokollblättern).

### *Anmerkung:*

Die Trägerplatte wird im Rahmen der hier vorgeschlagenen Versuche nicht ihrem gewöhnlichen Gebrauch nach eingesetzt. Im Krankenhausbereich wird die Apparatur verwendet, verschiedene Hefen (*Candida*) aufgrund von Stoffwechselunterschieden zu identifizieren.

Substratverwertung bei Hefen - Best.- Nr. 201.3956/Best.- Nr. 201.3132

Identifikationstabelle: Positive Reaktionen nach 48-72 Stunden Inkubationszeit (30°C) in %

API20 CAUX V2.2	0	GL U	GL Y	2KG	AR A	XL Y	ADO	XLT	GA L	IN O	SOR	MDG	NAG	CEL	LA C	MA L	SA C	TR E	MLZ	RAF	HYP H
<i>Candida albicans 1</i>	0	100	14	99	2	95	94	96	100	0	94	85	99	0	0	100	97	97	4	0	100
<i>Candida albicans 2</i>	0	100	0	100	0	90	1	75	100	0	70	0	100	0	0	90	0	5	0	0	90
<i>Candida ciferrii</i>	0	100	80	80	100	100	70	60	100	100	50	0	100	60	0	95	100	100	0	100	100
<i>Candida colliculosa</i>	0	100	60	100	0	0	0	20	1	0	90	0	0	0	0	100	85	0	75	0	0
<i>Candida famata</i>	0	100	98	100	60	80	100	90	100	0	100	99	99	98	70	100	100	99	80	95	1
<i>Candida glabrata</i>	0	100	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	94	0	0	1
<i>Candida guilliermondii</i>	0	100	100	88	90	93	94	99	99	0	97	96	99	99	0	94	100	99	94	95	46
<i>Candida humicola</i>	0	100	82	100	100	100	36	64	100	100	95	100	100	91	100	100	82	99	95	100	100
<i>Candida inconspicua</i>	0	100	77	57	0	0	0	0	2	0	0	0	43	0	0	0	0	0	0	0	3
<i>Candida kefyr 1</i>	0	100	69	0	31	91	4	47	100	0	39	0	0	8	99	0	100	1	0	100	89
<i>Candida kefyr 2</i>	0	100	86	7	0	7	0	71	100	0	100	86	0	71	84	100	100	93	100	84	40
<i>Candida krusei</i>	0	100	87	0	0	0	0	0	0	0	0	0	36	0	0	0	0	0	0	0	95
<i>Candida lambica</i>	0	100	70	0	0	95	0	0	0	0	0	0	90	0	0	0	0	0	0	0	100
<i>Candida lipolytica</i>	0	100	100	0	0	0	0	0	0	0	28	0	49	0	0	0	0	0	0	0	93
<i>Candida lusitanae</i>	0	100	95	95	1	80	95	40	40	0	99	60	95	80	0	100	99	100	99	0	100
<i>Candida magnoliae</i>	0	100	100	50	0	0	0	33	0	0	99	0	0	0	0	0	100	0	0	84	0
<i>Candida maris</i>	0	100	66	0	0	66	16	83	100	0	83	0	16	0	0	0	0	0	0	0	16
<i>Candida norvegensis</i>	0	100	75	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	95	0	0	0	0	0	0	100
<i>Candida parapsilosis</i>	0	100	95	91	96	96	95	3	99	0	99	93	99	0	0	100	100	97	99	3	99
<i>Candida pelliculosa</i>	0	100	100	0	0	67	2	9	56	0	89	100	2	78	0	93	100	97	98	48	86
<i>Candida rugosa</i>	0	100	74	0	5	79	5	44	100	0	99	0	55	0	0	0	0	0	0	0	100
<i>Candida tropicalis 1</i>	0	100	32	99	0	98	99	23	99	1	100	96	99	24	0	100	100	99	99	1	99
<i>Candida tropicalis 2</i>	0	100	6	100	0	100	99	4	100	0	100	0	100	0	0	48	4	100	0	0	100
<i>Candida zeylanoides</i>	0	100	100	95	0	0	5	0	1	0	100	0	100	0	0	0	0	74	0	0	100
<i>Cryptococcus albidus 1</i>	0	100	0	98	96	100	6	12	18	81	93	81	18	100	43	100	100	82	98	43	0
<i>Cryptococcus albidus 2</i>	0	100	0	97	96	100	0	6	0	68	75	50	0	100	0	100	100	93	93	68	0
<i>Cryptococcus laurenti</i>	0	100	15	92	100	100	69	76	100	84	53	76	92	96	99	92	99	92	96	99	0
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0	100	1	100	24	95	71	1	97	97	100	99	88	40	0	100	100	75	97	88	0
<i>Cryptococcus terreus</i>	0	100	0	100	76	100	0	0	45	36	100	0	90	95	36	9	9	54	0	0	0
<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>	0	100	12	100	100	100	12	0	1	99	50	87	95	0	0	100	100	62	100	25	0
<i>Geotrichum candidum</i>	0	100	100	0	0	100	0	0	100	0	66	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
<i>Geotrichum penicillatum</i>	0	100	100	0	0	100	0	0	83	0	88	0	5	0	0	0	0	0	0	0	100
<i>Kloeckera apis/apiculata</i>	0	100	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	66
<i>Kloeckera japonica</i>	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	66
<i>Rhodotorula glutinis</i>	0	100	50	12	87	87	50	37	62	0	37	25	0	0	0	87	100	87	87	100	4
<i>Rhodotorula minuta</i>	0	100	100	100	99	95	15	1	0	0	40	0	95	60	0	0	95	95	95	0	0
<i>Rhodotorula rubra 1</i>	0	100	50	0	66	87	58	41	78	0	29	1	0	1	0	99	100	98	95	95	8
<i>Rhodotorula rubra 2</i>	0	100	50	1	90	100	80	50	30	0	30	0	0	0	0	100	75	0	100	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae 1</i>	0	100	15	0	0	0	0	0	92	0	6	30	0	0	0	92	100	61	30	92	15
<i>Saccharomyces cerevisiae 2</i>	0	100	75	0	0	0	0	0	100	0	99	75	0	0	0	100	100	33	66	100	12
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	0	100	5	0	0	0	33	0	5	0	92	0	0	0	0	100	100	0	95	100	0
<i>Trichosporon cutaneum</i>	0	100	46	98	95	100	32	35	93	53	26	76	95	98	99	93	80	76	63	46	100
<i>Trichosporon capitatum</i>	0	100	90	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	100