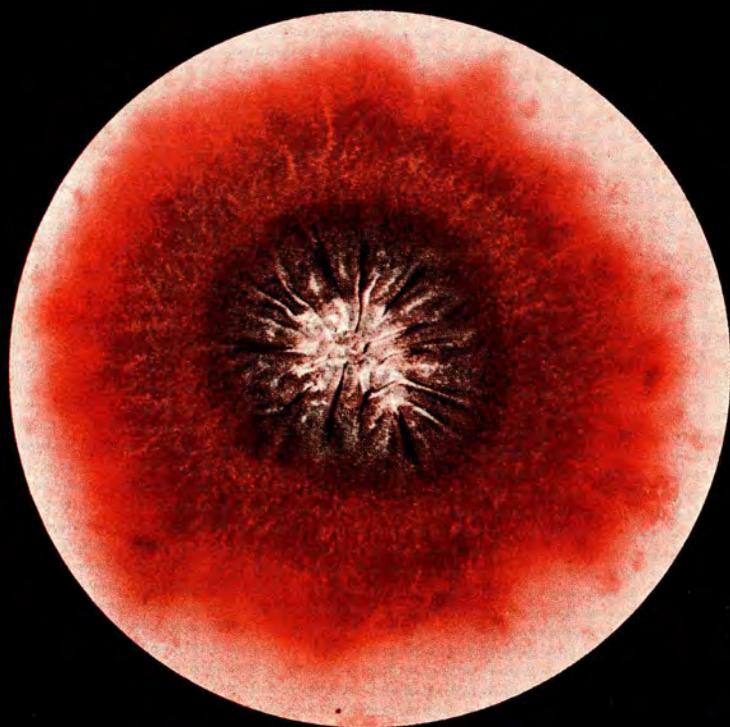


A 2547 E

# mykosen

Herausgeber und Schriftleiter: Hans Götz, Essen, Heinz Grimmer, Wiesbaden  
Detlev Hantschke, Essen, Wolf Meinhof, München, Hans Rieth, Hamburg



2/1970

1. Februar

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg/Lahn  
(Direktor: Prof. Dr. R. SIEGERT)

## Ein vereinfachtes Verfahren zum Nachweis fermentativer Leistungen der Hefen

H. BÜRGER

Die wichtigsten diagnostischen Verfahren zur Differenzierung der Hefen bestehen im Nachweis der Zuckerfermentation und -assimilation.

Durch die nachfolgend beschriebene Technik erübrigt sich das Auswaschen und Aushängern der Hefen, so daß die Prüfung der Fermentation nur einen Arbeitstag benötigt.

Hierzu wird die Oberflächenkultur einer Hefe mit Kochsalzlösung abgeschwemmt und die Hefesuspension in den Vertiefungen einer Kunststoffplatte mit den verschiedenen Zuckerlösungen vermischt. Die Vertiefungen werden mit Glasplättchen verschlossen. Werden die Zucker fermentiert, dann sammeln sich die im Laufe einiger Stunden entwickelten Gasblasen unter den Glasplättchen.

Der Nachweis der Assimilation erfolgt im Blättchentest, indem man vor dem Abschwemmen 3—4 volle Ösen mit Material in 1 ml Kochsalzlösung suspendiert und die Suspension mit Agar vergießt. Auf den erstarrten Agar werden zuckergetränkte Filterpapierscheibchen gelegt. Die Wachstumshöfe lassen sich innerhalb 24 h ablesen.

### Material und Methoden

#### *Anzucht und Ernte der Hefen*

24 Typstämme aus den Gattungen *Candida*, *Torulopsis*, *Trichosporon* und *Saccharomyces*, bezogen vom Centraal-Bureau voor Schimmelcultures in Delft, wurden untersucht (Tab. 1).

Die Anzucht der Hefen erfolgte auf Sabouraud-Dextrose- und -Maltose-Agar<sup>\*)</sup> mit Chloramphenicolzusatz (0,5 g/L) in normalen Petrischalen.

Nach 2—4tägiger Bebrütung bei 30° C wurden auf die dicht bewachsene Agaroberfläche 1,3—1,5 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung gegeben und die Hefen mittels Drigalski-Spatel in der Kochsalzlösung suspendiert. Von der Agaroberfläche ließen sich 0,8—1,0 ml Suspension absaugen.

#### *Reagenzien*

Zur Prüfung der Fermentation dienten 3 %ige Lösungen der Zucker D-(+)-Dextrose, D-(+)-Galactose, D-(+)-Saccharose, D-(+)-Lactose, Maltose und Raffinose mit Natriumphosphat (0,083 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  pro 100 ml Wasser) und Indikatorzusatz (0,017 g Bromthymolblau pro 100 ml Wasser). Der pH-Wert der Lösungen betrug 7,9—8,0. 10 ml einer Zuckerlösung reichten durchschnittlich für zwanzig Bestimmungen. Die Lösungen wurden vor dem Gebrauch zur Entgasung kurzfristig auf etwa 70° C erwärmt und bis auf 40° C abgekühlt.

Nichtverbrauchte Lösungen ließen sich tiefgefroren lagern. Die Herstellung der Lösungen konnte durch Tablettieren der Zucker (Tabletten zu 0,3 g) und der Phosphorsalz-Indikatormischung (Tabletten zu 0,1 g) vereinfacht werden.

#### *Vorrichtung zum Nachweis der Zuckervergärung*

Abbildung 1 zeigt einen schematischen Querschnitt durch eine Gärkammer, Abbildung 2 einen Ausschnitt aus einer Teflonplatte mit mehreren Kammern.

Die Bohrungen 1 und 2 einer Gärkammer sind zur Aufnahme der Hefesuspension und der Zuckerlösung bestimmt. Die Bohrung 3 dient als Überlauf bei starker Gasentwicklung.

<sup>\*)</sup>: Oxoid Ltd. 20 Southwark Bridge Road, London S. E. 1

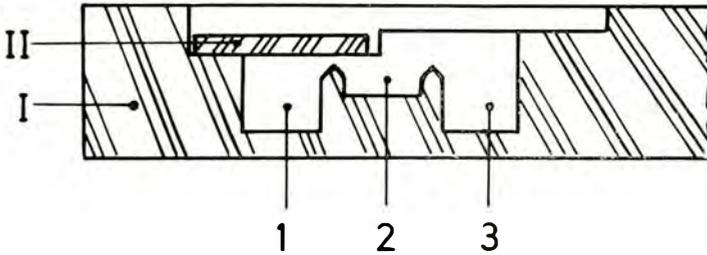


Abb. 1: Schematischer Querschnitt durch eine Gärkammer

Erläuterungen: I. Teflonplatte

II: Glasscheibchen

1, 2: Bohrungen zur Aufnahme der Hefesuspension und der Zuckerlösung 3: Überlauf

Nach der Füllung der Bohrungen 1 und 2 wird die Bohrung 1 vollständig, die Bohrung 2 teilweise durch ein Glasscheibchen abgedeckt. Die Füllungen in der Bohrung 1 und 2 stehen miteinander in Verbindung. Durch eine geringe Neigung des gesamten Gärtraumes gegen die Horizontale wird verhindert, daß sich in der Bohrung 1 befindliche Gasblasen in Richtung der Bohrung 2 bewegen. Die durch Gasbildung aus der Bohrung 1 herausgedrückte Flüssigkeit läuft in die Bohrung 3.

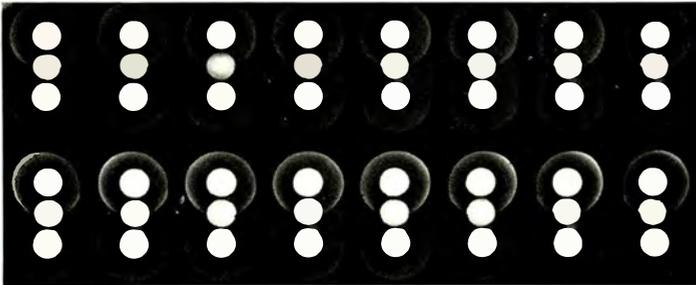


Abb. 2: Platte zur Fermentationsprüfung (Ausschnitt)

Abbildung 3 zeigt drei Kammern mit unterschiedlich starker Gasentwicklung.

Jede Teflonplatte\*) (90 × 245 × 20 mm) enthält 2 Reihen mit je 10 Gärkammern. Zur gleich-

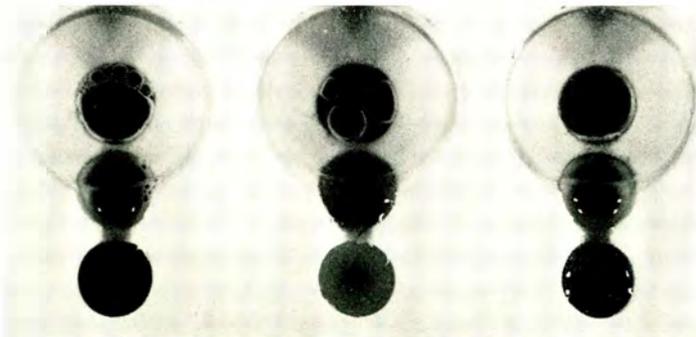


Abb. 3: Nachweis der Fermentation

Erläuterung: In den beiden äußeren Kammern war die Gasbildung so stark, daß Flüssigkeit, erkennbar an der dunklen Verfärbung in Bohrung 3, in den Überlauf gedrückt worden ist. Näheres im Text

\*) Hersteller: Fa. O. Kobe, Marburg/L, Rosenstr. 16

zeitigen Prüfung von 10 Hefen mit 6 Zuckern sind 3 Platten erforderlich.

Nach dem Gebrauch werden die Platten am besten zwei Stunden gekocht oder im Dampftopf behandelt.

#### *Fermentationsprüfung*

In die Bohrung 1 der Gärkammern gibt man zur besseren Durchmischung zunächst 1 Tropfen Zuckerlösung und fügt dann 3—4 Tropfen der dichten Hefesuspension hinzu. Anschließend füllt man die Bohrungen 1 und 2 mit Zuckerlösung bis zur Kommunikation der Flüssigkeiten und legt das Glasplättchen auf (Abbildung 4). Das Vorlegen eines Tropfens Zuckerlösung kann man sich sparen, wenn Keimsuspension und Zuckerlösung nach der Kammerfüllung einige Sekunden einem Vibrationsmischer ausgesetzt werden.

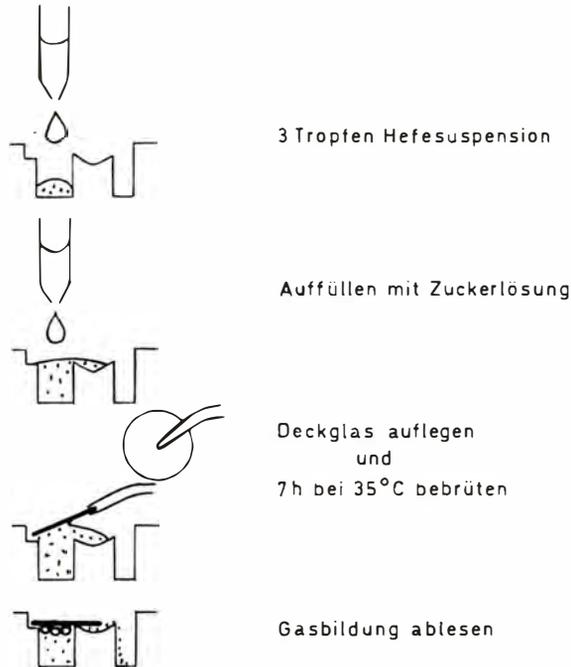


Abb. 4: Prüfung der Fermentation

Die Platten werden in eine feuchte Kammer gegeben und bei etwa 35° C stehen gelassen. Temperaturänderungen im Bereich zwischen 30 bis 37° C beeinflussen das Ergebnis nicht. Die Gasbildung wird nach 6—8 Stunden abgelesen.

Bei der Verarbeitung von 10 Hefen benötigt man für die Ernte und das Füllen der Kammern etwa 1 Stunde.

#### *Assimilationsprüfung*

3—4 volle Ösen werden in 1 ml phys. NaCl-Lösung suspendiert, mit 3 Tropfen Hefeextraktlösung<sup>\*)</sup> (100 mg pulv. Hefeextrakt/ml H<sub>2</sub>O) versetzt und mit 5 ml Agar (Jonagar Nr. 2<sup>\*\*</sup>) in Petrischalen vergossen. Auf den erstarrten Agar werden mit 50 %iger Zuckerlösung getränkte und getrocknete Filterpapierscheibchen (ϕ : 5 mm) gelegt.

Die Wachstumshöfe sind in den meisten Fällen nach 16—24 h zu beurteilen.

<sup>\*)</sup> Hefeextrakt, gepulvert; Fa. Merck, Darmstadt

<sup>\*\*</sup>) Oxoid Ltd. 20 Southwark Bridge Road, London S. E. 1

Tabelle 1

Hefen	Prüfung der						Assimilation				
	Fermentation						D	G	S	M	L
	D	G	S	M	L	R	D	G	S	M	L
<i>Candida lipolytica</i> CBS 599	—	—	—	—	—	—	+	(+) <sup>1)</sup>	—	—	—
<i>Candida mesenterica</i> CBS 602	—	—	—	—	—	—	+	—	+	+	—
<i>Candida curvata</i> CBS 570	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
<i>Candida krusei</i> CBS 573	+	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—
<i>Metschnikowia reukaufii</i> CBS 1903	+	—	—	—	—	—	+	+	+	+	—
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> CBS 610	+	—	—	—	—	—	+	+	+	+	—
<i>Candida parapsilosis</i> CBS 604	+	—	—	—	—	—	+	+	+	+	—
<i>Candida stellatoidea</i> CBS 1905	+	—	—	+	—	—	+	+	—	+	—
<i>Candida guilliermondii</i> CBS 566	+	—	+	—	—	+	+	+	+	+	—
<i>Candida utilis</i> CBS 621	+	—	+	—	—	+	+	—	+	+	—
<i>Candida albicans</i> CBS 562	+	(+)	—	+	—	—	+	+	+	+	—
<i>Candida tropicalis</i> CBS 94	+	(+)	+	+	—	(+)	+	+	+	+	—
<i>Candida claussenii</i> CBS 1949	+	+	—	+	—	—	+	+	+	+	—
<i>Candida pseudotropicalis</i> CBS 60	+	+	+	—	+	+	+	+	+	—	+
<i>Torulopsis inconspicua</i> CBS 180	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—
<i>Torulopsis glabrata</i> CBS 138	+	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—
<i>Torulopsis candida</i> CBS 161	+	—	(+)	—	—	—	+	+	+	+	—
<i>Torulopsis molischiana</i> CBS 136	+	—	—	—	—	—	+	—	—	+	—
<i>Torulopsis dattila</i> CBS 137	+	—	+	—	—	+	+	+	+	+	—
<i>Trichosporon capitatum</i> CBS 2364	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—
<i>Trichosporon cutaneum</i> <sup>2)</sup> CBS 2466	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CBS 381	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+	—
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CBS 1171	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+	—
<i>Kluyveromyces bulgaricus</i> ( <i>Saccharomyces fragilis</i> var. <i>bulgaricus</i> ) CBS 2762	+	+	+	—	+	(+)	+	+	+	—	+

<sup>1)</sup>: bei Zimmertemperatur wurden Dextrose und Galactose, bei 37° C nur Dextrose assimiliert.

<sup>2)</sup>: *Trichosporon cutaneum* wurde aus flüssigem Medium geerntet, da sich dieser Stamm nur sehr schwer von der Agaroberfläche abschwemmen ließ.

## Ergebnisse

Verglichen mit den Ergebnissen anderer Autoren (LODDER and KREGER-VAN RIJ [1952], REIFF, KAUTZMANN, LÜERS und LINDEMANN [1960], FRIEDRICH [1962]) ließen sich bei diesen Untersuchungen keine Abweichungen nachweisen.

In **Tabelle 1** sind Gärvermögen und Assimilation der auf Sabouraud-Dextrose- und -Maltose-Agar kultivierten Hefen aufgeführt. Abgesehen von der unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeit spielt die Wahl des Nährbodens keine Rolle.

Um einen Eindruck von der Geschwindigkeit der Zuckervergärung zu vermitteln, sind in **Tabelle 1** die Stundenzahlen für die Fälle angegeben, in denen während der Beobachtungszeit eine sehr starke Gasbildung mit Überlauf der Zuckerlösung nachzuweisen war.

### Tabelle 2

Fermentation von	Candida albicans (Trockengewicht der unverdünnten Suspension: 66,6 mg/ml) Verdünnungen mit phys. NaCl-Lösung:					
	unverd.	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40
Dextrose	+++ 1,5	+++ 2	+++ 2,5	++ 8	(+)	—
Maltose	+++ 2	+++ 2,5	+++ 3	+ 8	—	—
	Candida tropicalis (Trockengewicht der unverdünnten Suspension: 56,2 mg/ml) Verdünnungen mit phys. NaCl-Lösung:					
	unverd.	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40
Dextrose	+++ 1	+++ 2	+++ 3	+++ 7	++ 8	(+)
Saccharose	+++ 2,5	+++ 3	+++ 5	+++ 7	++ 8	—
Maltose	+++ 2	+++ 4	+++ 7	+ 8	—	—

Erläuterungen zur Tabelle im Text

Im Vergleich zu vorhergehenden Untersuchungen an nichtproliferierenden Sproßpilzen (BÜRGER, MÜLLER und PÖPPEL [1968]) stellt das hier beschriebene Verfahren durch den Fortfall von Zentrifugation und Waschen, sowie durch die verbesserten Gärkammern eine erhebliche Vereinfachung der Fermentationsprüfung dar. In dieser Weise kann jedoch nur zum Nachweis des Gärvermögens der Hefen verfahren werden. Beim Nachweis von Hydrolasen ist zum Ausschluß unkontrollierbarer, ausgeschwemmter Nährbodenbestandteile das Waschen der Hefen empfehlenswert.

Erläuterungen zu Tab. 1:

D: Dextrose  
G: Galactose  
S: Saccharose  
M: Maltose  
L: Lactose  
R: Raffinose  
+: Fermentation bzw. Assimilation der Zucker nachweisbar

(+): schwache Reaktion

—: keine Fermentation bzw. Assimilation

\*) Falls im Laufe der 8stündigen Versuchsdauer die Zuckerlösung durch starke Gasentwicklung teilweise in den Überlauf gedrückt wurde, ist die dazu benötigte Zeit in Stunden angegeben.

Die zur Vergärung der Zucker erforderliche Zeit ist in erster Linie von der Dichte der Hefesuspension abhängig. Diesen Einfluß demonstriert **Tabelle 2** an zwei Verdünnungsreihen der Suspensionen von *C. albicans* und *C. tropicalis*. Hierbei wurde das Auspressen der Zuckerlösung in den Überlauf als sehr starke Gasentwicklung (dreifach positiv), Blasenbildung über dem gesamten Boden des Glasscheibchens über Bohrung 1 als starke Gasentwicklung (zweifach positiv) und Bedeckung mit Gasblasen zu mindestens einem Viertel der Fläche als deutliche Gasbildung (einfach positiv) bewertet.

Oberhalb einer Dichte der Suspension von 15 mg Trockengewicht/ml war im Laufe einer achtstündigen Beobachtungszeit überall sehr starke Gasbildung nachweisbar. Erst unterhalb einer Dichte von 6 mg Trockengewicht/ml war die Gasentwicklung zu gering, um die Hefen zu identifizieren.

Beim Abschwemmen einer Petrischale mit Oberflächenkultur erhält man durchschnittlich Suspensionen mit 20—50 mg Hefe-Trockengewicht/ml.

### Zusammenfassung

Ein einfaches Verfahren zur schnellen Prüfung des Gärvermögens von Hefen wird beschrieben. Die Prüfung erfolgt auf einer mit verschiedenen Bohrungen versehenen Teflonplatte. Ein Teil dieser Bohrungen wird mit Hefesuspension und Zuckerlösung gefüllt und mit Glasscheibchen bedeckt. Die bei der Gärung gebildeten Gasblasen sammeln sich unter den Glasscheibchen.

Die Hefesuspension wird durch Abschwemmen einer Oberflächenkultur auf Sabouraud-Dextrose- oder -Maltose-Agar von einer normalen Petrischale erhalten.

Zentrifugieren, Auswaschen oder Aushungern der Hefen vor dem Test erübrigt sich.

Zur Verarbeitung von zehn Hefen wird eine Arbeitszeit von etwa einer Stunde benötigt. Die fermentativen Leistungen werden nach 6—8stündiger Bebrütung bei 35° C beurteilt.

In 24 Typstämmen der Gattungen *Candida*, *Torulopsis*, *Trichosporon* und *Saccharomyces* wurde die Brauchbarkeit der Methode für diagnostische Zwecke demonstriert.

### Summary

A simple method for the screening of sugar fermentation of yeasts is described, which makes centrifugation and starvation of yeast cells prior to the fermentation test unnecessary. Yeast cells suspended in sugar solution are placed in the holes of a teflonplate. The filled holes are closed with circular coverglasses. Gasbubbles developed by the fermentation process collect below the coverglasses. Results are recorded finally after 6—8 hours of incubation at 35° C.

The yeast cell suspension is obtained by rinsing off surface colonies grown on Sabouraud-dextrose respectively -maltose agar in usual Petri dishes.

The applicability of the method for the determination of yeasts has been demonstrated on 24 type strains of the genera *Candida*, *Torulopsis*, *Trichosporon*, and *Saccharomyces*.

### Schrifttum

1. BÜRGER, H., MÜLLER, H.-L., PÖPPEL, E.: Biochemische Leistungen von nichtproliferierenden Sproßpilzen. *Mycopath. Mycol. appl.* **34**, 241—252 (1968).
2. FRIEDRICH, E.: *Die Sproßpilze des Menschen*. Johann Ambrosius Barth Verlag, Leipzig, 1962.
3. LODDER, J., and KREGER-VAN RIJ, N. J. W.: *The yeasts, a taxonomic study*. North Holland Publishing Company, Amsterdam 1952.
4. REIFF, F., KAUTZMANN, R., LÜERS, H., LINDEMANN, M. L.: *Die Hefen*, Bd. 1. *Die Hefen in der Wissenschaft*. Verlag Hans Carl, Nürnberg 1960; S. 151—164.

Anschrift des Verfassers: Dr. H. BÜRGER, Hygiene-Institut der Universität, 3550 Marburg/Lahn, Pilgrimstein 2