

Grüne Biotechnologie Sommersemester 2015 (Teil Mikroalgen AG Lamparter)

Modul ANG-02B für Angewandte Biologen im 2. Semester

Name, Gruppe: _____

Hintergrund

Im Praktikumsteil werden Möglichkeiten biologischer Energiegewinnung besprochen. Heute bestehen bereits verschiedene Wege um Bioenergie zu gewinnen, z.B. konventionell direkt oder indirekt aus Agrarpflanzen (Biomasse, Biogas, Ethanol oder Diesel). Auf diese Art und Weise wird schon heute ein bedeutsamer Anteil regenerativer Energie gewonnen. Allerdings stößt man hier bereits an Grenzen, die vor allem in der Effizienz der vorhandenen Möglichkeiten aber auch in deren Konkurrenz zur Lebensmittelproduktion liegen.

Ein anderer Weg wird beschritten, indem man so genannte Mikroalgen für die Gewinnung der oben angegebenen Energieressourcen nutzbar macht. Mit Mikroalgen werden verschiedenste Organismen bezeichnet, die man aufgrund ihrer mikroskopischen Größe und ihrer Fähigkeit zur oxygenen Photosynthese zusammenfasst. Systematisch stellen Mikroalgen aber eine heterogene Gruppe nicht zusammengehöriger Organismen dar: Es handelt sich um verschiedenste Eukaryotische Algen und Cyanobakterien.

Mikroalgen wie z.B. die Grünalge *Chlamydomonas* und Cyanobakterien sind unter bestimmten Bedingungen in der Lage, molekularen Wasserstoff zu produzieren. Das gleiche gilt für Purpurbakterien. Im Praktikum wollen wir die Möglichkeit, Organismen zur Wasserstoffproduktion zu nutzen, bearbeiten. Da es im Vergleich zu Mikroalgen deutlich einfacher ist, mit Purpurbakterien größere Mengen Wasserstoff zu generieren, wird die Wasserstoffproduktion im Praktikum exemplarisch an *Rhodobacter capsulatus* betrachtet. Es ist wichtig, die grundlegenden Unterschiede zwischen Purpurbakterien, Grünalgen und Cyanobakterien zu verstehen: Der Photosynthese-Apparat ist unterschiedlich aufgebaut und es werden verschiedene Pigmente genutzt. Schwefelfreie Purpurbakterien wie *Rhodobacter* benötigen nach wie vor einen großen Input an energiereichem organischem Substrat, das sie als Elektronendonoren in der Photosynthese nutzen. Sie sind damit photoorganotroph. Cyanobakterien wie z.B. *Anabaena* PCC 7120 können dagegen vollständig phototroph wachsen, d. h. die Energie entstammt ausschließlich dem Licht; Wasser als Elektronenquelle wird gespalten und Sauerstoff wird gebildet. Cyanobakterien können daher in einem fast reinen Salzmedium wachsen.

Im Praktikum „Grüne Biotechnologie“ widmen wir uns unter anderem der mikrobiologischen Arbeitstechnik, eine Grundlage für das Arbeiten mit Mikroalgen. Es werden Kulturen überimpft und ihr Wachstum wird nachvollzogen (**Versuch 3**). Dabei ist es auch wichtig, die verschiedenen Zellformen zu betrachten und die Auswirkungen auf verschiedene Verfahren zur Zellzahlbestimmung zu diskutieren (**Versuch 1**). Mit der wichtigste Aspekt bei der Energiegewinnung durch Mikroalgen ist die Energieumwandlung in der Photosynthese. Daher führen wir im Praktikum photometrische Messungen durch, um Photosynthese Pigmente zu identifizieren (**Versuch 2**).

In einem Versuch wird untersucht, ob und wieviel Wasserstoff durch *Rhodobacter* und durch *Anabaena* produziert wird (**Versuch 4**). Die Zellkulturen müssen unter Ausschluß von Sauerstoff wachsen. Der Nachweis von Wasserstoff geschieht sowohl über eine Brennstoffzelle als auch über Gaschromatographie.

Versuch 1 – Mikroskopie

Am ersten Kurstag werden Kulturen verschiedener Mikroorganismen bereitgestellt (Tab. 1). Die verschiedenen Morphologien werden zunächst am Mikroskop betrachtet.

- Hierzu werden unter sterilen Bedingungen aus jedem Kulturgefäß 100 µl in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert. Eine Probe reicht für alle Teilnehmer (→ Gefäße für alle verständlich beschriften).

- Hieraus werden 10 µl Kultur auf einen Objektträger gebracht und ein Deckgläschen aufgelegt (wiederum ein Objekt für alle Teilnehmer). Um ein Austrocknen des Präparats zu verhindern, wird das Deckgläschen ringsum mit Nagellack versiegelt.

- Am Mikroskop werden nun alle Proben betrachtet. Bitte beachten Sie, dass filamentöse Cyanobakterien aus mehreren Zellen bestehen. Beschreiben Sie fürs Protokoll Zellform, Größe, Farbe usw.

- Es steht ein Mikroskop mit Kamera zur Verfügung. An diesem soll von jedem Objekt eine Aufnahme für das Protokoll gemacht werden.

- Außerdem soll jeder Teilnehmer die Zelldichte (bzw. Filamentdichte) einer Probe mit Hilfe einer Zählkammer (Fuchs-Rosenthal oder Neubauer, siehe Anhang) bestimmen. Im Protokoll soll diese Art der Zellzahlbestimmung mit anderen Verfahren verglichen werden.

Tabelle 1: Mikroskopie

Gruppe	ID	Objekt	Größe	Zell-oder Filament-dichte	Farbe	Zellform	Motilität	Taxonom. Einordnung
A	A	<i>Oscillatoria</i> HE10JO						
	B	<i>Synechocystis</i> PCC6803						
	C	<i>Synechocystis</i> KivD (GVO)						
	D	<i>Synechocystis</i> petJPDCADH						
B	E	<i>Anabaena</i> PCC 7120 (Bg11_0)						
	F	<i>Phaeodactylum</i> <i>tricornutum</i>						
	G	<i>Rhodobacter</i> <i>capsulatus</i>						

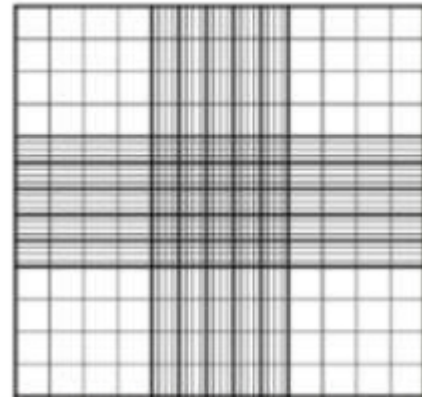


Abbildung 1: Neubauer Zählkammer (Gesamtfläche : 9 mm² , Tiefe 0,1 mm, Rauminhalt : 0,9 µl)

Versuch 2 - Pigmente

Alle im Kurs verwendeten Organismen zeichnen sich durch ihre Fähigkeit zur Photosynthese aus. Diese Fähigkeit, die Energie des Sonnenlichts in chemischen Komponenten zu fixieren, möchte man sich zunutze machen und sie für die Gewinnung von regenerativen Energieträgern einsetzen. Bei der Betrachtung der Kulturen und der Zellen unter dem Mikroskop fallen die verschiedenen Farben der Organismen auf. Die Farben beruhen auf unterschiedlichen Pigmenten, die im Licht (das ist der vom Menschen wahrnehmbare Bereich des elektromagnetischen Spektrums) absorbieren. Um einen Eindruck über die Zusammensetzung der Pigmente zu erhalten, wird ein Spektrum der Zellen am Photometer aufgezeichnet. Da jede Zelle mehrere Pigmente enthält, setzt sich jedes Spektrum aus mehreren Komponenten zusammen. Die dominierenden Pigmente lassen sich anhand der Wellenlänge zuordnen. (Siehe auch Abb. 2).

Da die Zellen in den Kulturen als Partikel das Licht auch streuen, wird im Versuch eine sogenannte Ulbrichtkugel verwendet. Diese minimiert den Verlust des Messlichts, das durch Streuung für die Messung verloren geht. Beachten Sie: Für die Messungen in Versuch 3, in denen die Zelldichte bestimmt werden soll, wird genau diese Streuung genutzt. Das bedeutet, dass im einen Fall – für die Messung von Pigmenten - die Streuung minimiert werden soll, im anderen Fall - bei der Zelldichtemessung - die Absorption von Pigmenten vermieden werden muss. (Wie wird dies erreicht?) Bestimmen Sie in den gemessenen Spektren für jeden Organismus die Wellenlängen der auffälligsten Minima und die Maxima. (Hier wird nicht die Absorption, sondern die optische Dichte gemessen, was ist der Unterschied?).

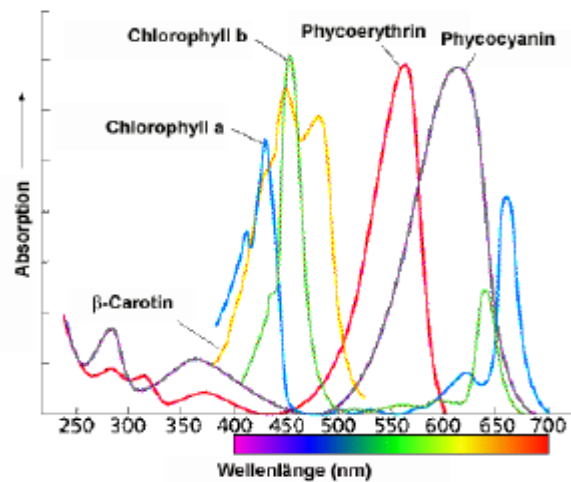


Abbildung 2: Absorptionsspektren verschiedener Photosynthese-Pigmente

- Es werden von jeder Kultur unter sterilen Bedingungen 2 ml in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert.
- Am Photometer wird die Probe in eine Mikroküvette überführt. Mit Hilfe der Ulbrichtkugel wird das Extinktionsspektrum von 350 – 900 nm aufgezeichnet. Die gemessenen Maxima sollten zwischen 0,05 und 1 liegen.
- Gegebenenfalls muss die Probe zurück in das Eppendorf-Gefäß pipettiert, verdünnt und abermals gemessen werden, um diese Werte einzuhalten.

Versuch 3 – Wachstum

Von Cyanobakterien können nicht so einfach Kryokulturen (d.h. eingefrorene Erhaltungen) wie bei andere Bakterien angefertigt und nur bei Bedarf weiter kultiviert werden. Sie müssen daher in ständiger Kultur gehalten werden. Hierzu werden sie regelmäßig auf frisches Medium (i.d.R. Festmedium) überimpft. Für Experimente werden oft Flüssigkulturen gebraucht, in welchem die Zellen in einer richtigen Zelldichte und Wachstumsphase vorliegen müssen. Im Kurs werden alle genutzten Kulturen in frisches Flüssigmedium überimpft. Durch Zelldichtemessungen am Photometer wird das Wachstum (Zunahme der Zelldichte) quantifiziert. Für die Energiegewinnung sind prinzipiell schnell wachsende Stämme besser geeignet, weil das schnellere Wachstum auf eine effektivere Photosynthese hindeutet. Daher ist es auch immer wichtig, Wachstumsraten von neuen Stämmen zu bestimmen und optimale Wachstumsparameter zu ermitteln.

- Von den Kulturen werden 2 ml in 11 ml frisches, vom jeweiligen Organismus benötigtes Medium (Tab. 2) überführt. Dies entspricht einer 2/13-Verdünnung. Schütteln Sie die Kulturen zuvor, um eine möglichst gute Homogenität zu erreichen.
- Die optische Dichte der neu beimpften Kultur wird als Start-OD, und nach einer Woche, als End-OD, bestimmt (geeignete Wellenlänge λ siehe Versuch 2).
- Die neu beimpften Kulturen werden im Kulturraum bei 25 °C unter Leuchtstoffröhren (ca. 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) kultiviert.

Tabelle 2: Photometrie

Gruppe	ID	Objekt	Farbe	λ_{max}	λ_{min}	Pigmente	λ für Zelldichte	OD λ
A	A	<i>Oscillatoria</i> HE10JO	f/2				750 nm	
	B	<i>Synechocystis</i> PCC6803	BG11				750 nm	
	C	<i>Synechocystis</i> KivD (GVO)	BG11				750 nm	
	D	<i>Synechocystis</i> petJPDCADH	BG11				750 nm	
B	E	<i>Anabaena</i> PCC 7120 (Bg11_0)	BG11-0				750 nm	
	F	<i>Phaeodactylum</i> <i>tricornutum</i>	f/2				750 nm	
	G	<i>Rhodobacter</i> <i>capsulatus</i>	PBM				750 nm	

Tabelle 3: Wachstum

Gruppe	ID	Objekt	Medium	λ für Zelldichte	Start-OD λ (OD λ Tag 1)	End-OD λ (OD λ Tag 7)	Homogenität
A	A	<i>Oscillatoria</i> HE10JO	f/2	750 nm			
	B	<i>Synechocystis</i> PCC6803	BG11	750 nm			
	C	<i>Synechocystis</i> KivD (GVO)	BG11	750 nm			
	D	<i>Synechocystis</i> petJPDCADH	BG11	750 nm			
B	E	<i>Anabaena</i> PCC 7120 (Bg11_0)	BG11-0	750 nm			
	F	<i>Phaeodactylum</i> <i>tricornutum</i>	f/2	750 nm			

G	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	PBM	750 nm			
H	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	PBM	750 nm			

Versuch 4 – Wasserstoffproduktion

Alle im Kurs verfügbaren Prokaryoten können Wasserstoff produzieren, allerdings sind die Produktionsraten sehr unterschiedlich. Bei uns im Labor gelang der Wasserstoff-Nachweis bisher nur für das Purpurbakterium *Rhodobacter capsulatus*. Bei den Cyanobakterien erwartet man nur geringe Mengen von Wasserstoff, die voraussichtlich unter der Nachweisgrenze liegen. Im Kurs soll eine Kultur *Rhodobacter capsulatus* und eine Kultur *Anabaena* PCC7120 angesetzt werden. Voraussetzung für die Wasserstoff-Produktion sind Stickstoffmangel (bei Cyanobakterien) sowie anaerobe Bedingungen. Das Kulturgefäß soll luftdicht abgeschlossen sein, aber die Möglichkeit zum Volumenausgleich besitzen. Eine Möglichkeit ist in Abbildung 3 dargestellt. Bei *Rhodobacter* werden Reste von Sauerstoff durch die Atmung der Zellen verbraucht, bei *Anabaena* sollte die Kultur mit Argon überschichtet werden. Wichtig: Gefäße müssen autoklaviert sein und steril bleiben!

Rhodobacter capsulatus Kultur

Um unter Kursbedingungen eine anhaltende Gasentwicklung sicherzustellen, soll das Kulturvolumen 120 ml betragen und die Start-OD_{700 nm} bei 0,05 liegen.



Abbildung 3: *Rhodobacter*-Kultur für die Wasserstoffproduktion

- Bestimmen Sie die OD 750 nm (ohne Ulbrichtkugel, Schichtdicke 1 cm) und errechnen Sie, welches Volumen Kultur mit wie viel Medium versetzt werden muss, um 120 ml mit einer OD_{750 nm} von 0,05 zu erhalten.
- Führen Sie die Verdünnung im Kulturgefäß (100 ml Schott Flasche) durch und bestimmen Sie wiederum die tatsächliche OD_{700 nm}.
- Die Kultur wird entgast und das Kulturgefäß verschlossen. Die Kultur wird auf einem Magnetrührer im Licht einer Natriumdampfdruck-Lampe (200 – 300 μmol cm⁻² s⁻¹ Photonen) für eine Woche „bebrütet“.
- Am zweiten Kurstag wird das aufgefangene Gasvolumen bestimmt. (Notieren!)
- Eine Probe des entstandenen Gases wird auf ihren Wasserstoffgehalt mit Hilfe einer *Proton Exchange Membrane* (PEM) Brennstoffzelle getestet. Hierzu muss die Probe mit einer Spritze aus dem Gasauffang des Kulturgefäßes entnommen und direkt an einen Gasanschluss der Brennstoffzelle gekoppelt werden.

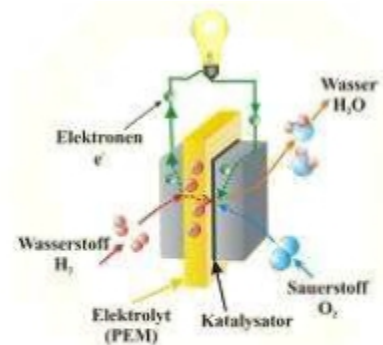


Abbildung 4: Funktionsprinzip einer PEM-Brennstoffzelle

- Der Anschluss der anderen Seite der Brennstoffzelle bleibt offen. Sie ist damit dem Sauerstoff der Luft ausgesetzt. Die maximal generierbare Spannung (angeschlossenes Voltmeter) wird notiert.
- Eine zweite Probe wird für eine Analyse mittels Gaschromatographie (GC) abgenommen. Die GC wird mit den in Tabelle 5 angegebenen Parametern durchgeführt. Neben den Gasproben der Kulturen werden hier zusätzlich ein Wasserstoffstandard, ein Argonstandard und Laborluft als Kontrolle gemessen.

Anabaena Kultur

Parallel zum anderen Ansatz wird eine 120 ml *Anabaena* PCC 7120 Kultur hergestellt. Eine möglichst hohe Zelldichte sollte eingestellt werden. Gehen Sie so vor wie bei *Rhodobacter*, die *Anabaena* Kultur muss allerdings mit Argon überschichtet und dann unter schwachem Licht gerührt oder geschüttelt werden.

Tabelle 4: Gasproduktion der Kulturen

Objekt	Medium	Vorkultur - OD _λ	Verdünnung	Start-OD (OD _λ Tag 1)	End-OD (OD _λ Tag 7)	Gasvolumen	Max. Spannung
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	PBM						
<i>Anabaena</i> PCC 7120	BG11-0						

Tabelle 5: Parameter für den Wasserstoffnachweis mittels Gaschromatographie

Injektion	1 ml (mit 1 ml Gasspritze)
GC	GC Agilent 6890
Detektor	Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD), Temp. 210 °C
Säule	Molekularsieb (HP 19091P-MS7), 15 m x 0,32 mm x 25 µm, Maximale Temp. 300 °C; 0,72 bar Druck
Flow	konstant 1,4 ml/min
Trägergas	Argon (5.0)
Injektor	Split 2:1, Temp. 80 °C
Signal	Save Data: 50 Hz

Versuch 5 - Bestimmung der Ethanolkonzentration

Die Kulturen C oder D könnten Ethanol produziert haben. Von diesen Kulturen 1 ml abzweigen. Von Probe D alle Zellen zentrifugieren, in 1 ml resuspendieren und mit French Press extrahieren. insgesamt sind es 3 Proben, die gemessen werden sollten.

ADH-Stammlösung: 15 mg werden in 5 ml dest. Wasser gelöst.

Ethanol-Verdünnungen: 0,1, 1, 2 Vol%.

Lösung 1: 751 mg Glycin in 100 ml 100 mM Natronlauge

Lösung 2: 0,112 g Semicarbazid-hydrochlorid in 10 ml 100 mM Natronlauge

Reaktionspuffer:

30 ml Natronlauge, 70 ml Lösung 1 und 10 ml Lösung 2 mischen. Mit 100 mM Salzsäure auf pH 8,6 einstellen.

10 mg NAD in 1 ml Reaktionspuffer lösen.

Durchführung

In der Küvette 750 μ l Reaktionspuffer und 50 μ l NAD-Lösung mischen. Dann 150 μ l Lösung zugeben und mit einer 100 μ l Pipette vermischen und sofort $A_{340\text{nm}}$ messen.

Nun 50 μ l ADH-Lösung zugegeben, erneut vermischen und zügig wieder messen. Danach kontinuierlich weiter messen.

Mit anderen Alkoholkonzentrationen wiederholen.

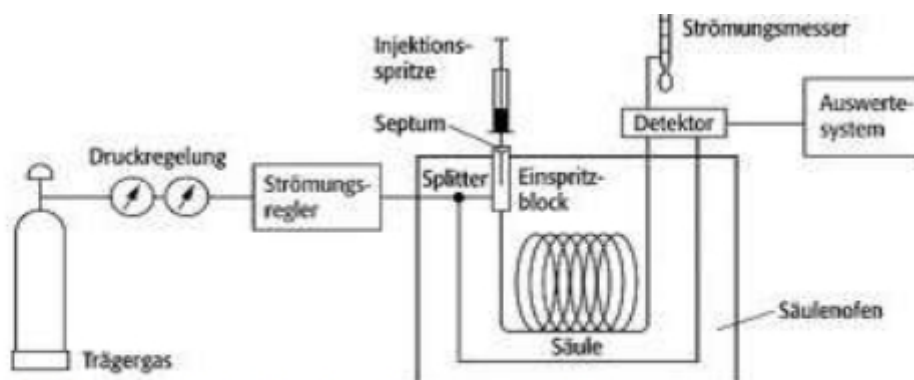


Abbildung 5: Funktionsprinzip der Gaschromatographie
Mit anderen Alkoholkonzentrationen wiederholen.

Anhang

Organisation Kursteil Mikroalgen

Tag 1

- Theoretische Einführung
- Versuch 1 Mikroskopie: Proben nehmen, Objekte am Mikroskop beschreiben, Photos machen, Zellzahlen bestimmen
- Versuch 3 Wachstum: Kulturen animpfen, Start-OD bestimmen
- Versuch 4 Wasserstoffproduktion: Kulturen messen, animpfen, „Reaktor“ aufbauen, Start-OD bestimmen

Vorgehensweise am besten wie folgt:

- Kulturen nacheinander (aber für die Versuche parallel) an der Sterilbank „verarbeiten“. Die Teilnehmer werden hierfür in zwei 3er Gruppen mit je einem Betreuer eingeteilt. Jeder Teilnehmer übernimmt eine Kultur (die beiden Betreuer zeigen das Vorgehen ebenfalls an einer Kultur).
- Die Medien Bg11, f/2 müssen noch angesetzt werden. Beide Gruppen überlegen/rechnen wie man das Medium ansetzt.
- Jeweils Medium vorlegen und mit 2 ml Vorkultur Animpfen. Proben nehmen
 - × 100 µl Vorkultur für Versuch 1 Mikroskopie
 - × 3x 1 ml neue Kultur für Versuch 3 Wachstum (OD-Messung).
- OD-Messungen am Photometer für Versuch 3
- *Rhodobacter*-Kultur und *Anabaena* Kultur für Wasserstoffproduktion ansetzen (evtl. jede Gruppe einen Ansatz)
- Mikroskopie

Tag 2

- Test
- Besprechung Ergebnisse vom ersten Tag
- Mikroskopie
- Versuch 2 Photometrie: Proben nehmen, Spektren aufzeichnen
- Versuch 3 Wachstum: End-OD bestimmen
- Versuch 4 Wasserstoffproduktion: Gasproben nehmen, Test an Brennstoffzelle, Analyse am Gaschromatographen, End-OD bestimmen

Vorgehensweise am besten wie folgt:

- Gasproben nehmen
- Test des Gases an Brennstoffzelle mit Multimeter
- Test des Gases mittels GC
- An der Sterilbank je Kultur 2 ml in Eppendorf-Gefäß überführen, Messung von Extinktionsspektren der Proben am Jasco-Photometer
- OD-Messungen am Photometer für Versuch 3, 3x 1 ml jeder Kultur (wie an Tag 1)

Kulturmedien

PBM - Standardnährlösung für Purpurbakterien (*Rhodobacter capsulatus*)

Das Medium wird vor Gebrauch frisch aus den sterilen Einzelkomponenten (Lösung 1, Kaliumphosphatpuffer, Vitaminlösung und Reinstwasser) angesetzt.

Für 1 Liter Medium wird benötigt:

Reagenz / Gesamtvolumen	Für 1 Liter	Für 120 ml	Für 10 ml
100 ml Lösung 1 (10x)	100 ml		
100 ml Kaliumphosphatpuffer (10x)	100 ml		
1 ml Vitaminlösung (1000x)	1 ml		
Mit doppelt destilliertem Wasser auf Gesamtvolumen auffüllen			

Zusammensetzung der Reagenzien für das Protokoll

Lösung 1 (für 1 Liter 10x-Konzentrat):

Milchsäure (90%) 40 g
 L-Glutaminsäure 10,3 g
 Magnesiumsulfat-Heptahydrat 2 g
 Calciumchlorid-2-Hydrat 0,75 g
 EDTA NaFe(III)-Salz-Trihydrat 0,32 g
 Minimalsalzlösung 10 µl

→ Minimalsalzlösung (für 1 Milliliter):

Mangan(II)chlorid 400 mg
 Kobalt(II)chlorid 160 mg
 Kupfer(II)sulfat 40 mg
 Natriummolybdat 120 mg
 Zink(II)chlorid 80 mg
 Lithiumchlorid 20 mg
 Zinn(II)chlorid 20 mg
 Borsäure 40 mg
 Kaliumbromid 80 mg
 Kaliumiodid 80 mg
 Bariumchlorid 20 mg

Der pH wird auf 7,4 mit NaOH eingestellt. Achtung es sind zunächst fast 40 ml 10 M NaOH nötig um auf einen pH von > 6 zu kommen. Dann geht es ziemlich schnell (wenig 1 M NaOH).

Die Lösung wird autoklaviert (20 min bei 121 °C). Erst danach wird der Kaliumphosphatpuffer und die Vitaminlösung dazugegeben.

Kaliumphosphatpuffer (für 1 Liter 10x-Konzentrat):

Di-Kaliumhydrogenphosphat 90 g
 Kaliumdihydrogenphosphat 60 g

Der pH sollte kontrolliert und gegebenenfalls mit NaOH auf 7,4 gebracht werden. Der Puffer wird separat autoklaviert (20 min bei 121 °C) und erst vor Gebrauch mit Lösung 1, der Vitaminlösung und sterilem Reinstwasser gemischt.

Vitaminlösung (10 ml 1000x):

Thiaminiumdichlorid 1 ml
 Nicotinsäure 1 ml
 4-Aminobenzoessäure 0,1 ml
 Biotin 0,01 ml

Mit Reinstwasser auf 10 ml bringen und sterilfiltrieren. Die Lösung wird im Kühlschrank aufbewahrt.

Vitamine einzeln (je 1,1 ml):
 Thiaminiumdichlorid 10 mg/ ml
 Nicotinsäure 10 mg/ ml
 4-Aminobenzoessäure 20 mg/ ml
 Biotin 15 mg/ ml

BG- 11 Medium (für Cyanobakterien;Fluka 14310 BG-11 Broth Blue Green Medium)

Reagenz / Gesamtvolumen	Für 10 ml
BG-11-Stockösung (50x konzentriert)	
TES-Stocklösung pH 8 (10x konzentriert)	
Mit doppelt destilliertem Wasser auf Gesamtvolumen auffüllen	

Das Volumen der benötigten Stocklösung muss so berechnet werden, dass es in dem gewünschten Gesamtvolumen zu einer einfach konzentrierten Lösung verdünnt wird.

Zusammensetzung der Reagenzien für das Protokoll

BG- 11 Medium

Natriumnitrat 1500 mg/l
 di-Kaliumhydrogenphosphat 31,4 mg/l
 Magnesiumsulfat 36,0 mg/l
 Calciumchlorid Dihydrat 36,7 mg/l
 Natriumcarbonat 20,0 mg/l
 Di-Natrium-Magnesium EDTA 1,0 mg/l
 Zitronensäure 5,6 mg/l
 Eisenammoniumcitrat 6,0 mg/l

pH 7,1 mit NaOH (1 M)*

1,637g /Liter Bidest. Wasser lösen, Autoklavieren 15 min 121°C. Aufbewahren bei 4°C im Dunkeln

* **BG-11 liegt als 50x Lösung vor. Zusätzlich muss zu dem Medium 10 mM TES mit einem pH von 8 hinzugefügt werden.**

r

BG- 11-0 Medium (ohne Stickstoff)

Wurde bereits als 1-fach konzentriertes Medium angesetzt

Zusammensetzung der Reagenzien für das Protokoll

BG- 11-0 Medium (ohne Stickstoff)

NaCl 1020 mg/l
 di-Kaliumhydrogenphosphat 31,4 mg/l
 Magnesiumsulfat 36,0 mg/l
 Calciumchlorid Dihydrat 36,7 mg/l
 Natriumcarbonat 20,0 mg/l
 Di-Natrium-Magnesium EDTA 1,0 mg/l
 Zitronensäure 5,6 mg/l
 Eisencitrat 5,6 mg/l

pH 8 mit 100 mM HCl

Autoklavieren 15 min 121°C. Aufbewahren bei 4°C im Dunkeln

F/2 Medium (für Cyanobakterien und Diatomeen)

Reagenz / Gesamtvolumen	Für 1 Liter	Für 10 ml
Filtriertes Seewasser (2 x konzentriert)		
Na NO ₃ (75,0 g/l H ₂ O)	1 ml	
NaHPO ₄ *H ₂ O (5,0 g/l H ₂ O)	1 ml	
Na ₂ SiO ₃ *9 H ₂ O (30,0 g/l H ₂ O)	1 ml	
F/2 Spurenelementlsg.	1 ml	
F/2 Vitamlsg. 0,5 ml	0,5 ml	
Mit doppelt destilliertem Wasser auf Gesamtvolumen auffüllen		

Auch hier wird das Volumen des Seewassers so bestimmt, das es im gewünschten Gesamtvolumen zu einer 1-fach konzentrierten Lösung verdünnt wird.

Zusammensetzung der Reagenzien für das Protokoll

F/2-Medium

Na NO₃ (75,0 g/l H₂O) 1 ml
NaHPO₄*H₂O (5,0 g/l H₂O) 1 ml
Na₂SiO₃*9 H₂O (30,0 g/l H₂O) 1 ml
F/2 Spurenelementlsg. 1 ml
F/2 Vitamlsg. 0,5 ml
filtriertes Seewasser ad 1000 ml

Autoklavieren bei 121°C und 15 Minuten.

F/2 Spurenelementlsg.

FeCl₃*6 H₂O 3,15 g
NaEDTA*2 H₂O 4,36 g
CuSO₄*5 H₂O (9,8 g/L H₂O) 1 ml
Na₂MoO₄*2 H₂O (6,3 g/L H₂O) 1 ml
ZnSO₄*7 H₂O (22,0 g/L H₂O) 1 ml
CoCl₂*6 H₂O (10,0 g/L H₂O) 1 ml
MnCl₂*4 H₂O (180 g/L H₂O) 1 ml
Destilliertes Wasser ad 1000ml

F/2 Vitamin Lösung:

Vitamin B12 (1,0 g/l dH₂O) 1 ml
Biotin (0,1 g/L dH₂O) 10 ml
Thiamin HCL 200 mg
Destilliertes Wasser ad 1000 ml
Sterilfiltrieren, bei 4°C lagern

Künstliches Seewasser (Kester, D. R., Duedall, I. W., Connors, D. N. and Pytkowicz, R. M. (1967). Preparation of Artificial Seawater. Limnology & Oceanography 12,176-179):

NaCl 23,93 g/l
Na₂SO₄ 4,00 g/l
KCl 0,68 g/l
NaHCO₃ 0,2 g/l
KBr 0,1 g/l
H₃BO₃ 0,03 g/l
NaF 0,003 g/l
MgCl₂*6 H₂O (1,0 M) 53 ml
CaCl₂*2 H₂O (1,0 M) 10 ml
SrCl₂*6 H₂O (0,1 M) 0,1 ml

Pro 99 Medium (für Cyanobakterien *et al*) (Turks Island Salt Mix: Merck Index. Nutrient Additions: Rippka et al (2000) Int.J.

Zusammensetzung der Reagenzien für das Protokoll

Syst. Evol. Microbio. 50:-1833-47)

NaCl 481 mM
CaCl₂*2 H₂O 10 mM
KCL 9 mM
MgSO₄*7 H₂O 28 mM
MgCl₂*6 H₂O 27 mM
NaH₂PO₄* H₂O 50 µM
(NH₄)₂SO₄ 400 µM
NaHCO₃ 6 mM
Hepes 1 mM
Metal Additions (1/10 concentrations used for Pro99 Media)
Na₂EDTA*2 H₂O 0,117 µM
FeCl₃*6 H₂O 0,118 µM
ZnSO₄*7 H₂O 0,0008 µM
CoCl₂*6 H₂O 0,0005 µM
MnCl₂*4 H₂O 0,009 µM
Na₂MoO₄*2 H₂O 0,0003 µM
Na₂SeO₃ 0,001 µM
NiCl₂*6 H₂O 0,001 µM

Folgende Komponenten werden als Lösungen mit definiertem pH zuvor angesetzt
25mM NaH₂PO₄* H₂O (pH 7,5), store sterile stock in 4°C refrigerator
0,4M (NH₄)₂SO₄, store sterile stock in 4°C refrigerator
0,5M Hepes (pH 7,5), store sterile stock in 4°C refrigerator