

Grüne Biotechnologie Sommersemester 2017, Teil Microalgen, AG Lamparter

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

Name, Gruppe: _____

Hintergrund

Im diesem Praktikumsteil geht es um die Möglichkeiten, aus Organismen Kraftstoffe zu gewinnen. Solche Biokraftstoffe können entweder aus Agrarpflanzen (Biokraftstoffe der 1. Generation), aus Lignocellulose (Biokraftstoffe der 2. Generation) oder aus Microalgen (Biokraftstoffe der 3. Generation) gewonnen werden. Heute wird ein bedeutsamer Anteil der Kraftstoffe über Agrarpflanzen (1. Generation) gewonnen. Diese Art der Energiegewinnung steht jedoch in Konkurrenz mit der Produktion von Lebensmitteln.

Unter dem Begriff Microalgen werden sowohl eukaryotische einzellige oder vielzellige Algen als auch Cyanobakterien zusammengefasst. Systematisch stellen Microalgen also eine heterogene Gruppe dar. Microalgen lassen sich in Bioreaktoren prinzipiell überall kultivieren. Wenn Biokraftstoffe aus Microalgen gewonnen werden, gibt es daher nicht mehr zwangsläufig eine Konkurrenz mit der Lebensmittelproduktion. Mit Hilfe von Microalgen kann man höhere Erträge pro Flächeneinheit erzielen als mit Agrarpflanzen.

Durch die Expression von Alkohol Dehydrogenase und Pyruvat Dehydrogenase ist es möglich, in Cyanobakterien Ethanol zu produzieren. Aus Mais gewonnenes Bioethanol könnte durch Bioethanol aus Microalgen ersetzt werden. Im Praktikum untersuchen Sie ein transformiertes einzelliges Cyanobacterium, *Synechocystis* PCC 6803, welches Ethanol produziert. Sie sollen vergleichen, wie viel Ethanol im Medium und in einem Zellextrakt vorliegt und ob in Kontrollen evtl. auch Ethanol produziert wird.

Als weitere biogene Energiequelle wird molekularer Wasserstoff (H_2) diskutiert. Microalgen wie z.B. die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* oder Cyanobakterien sind unter bestimmten Bedingungen in der Lage, H_2 zu produzieren. Das gleiche gilt für Purpurbakterien wie *Rhodobacter capsulatus*. Im Praktikum arbeiten wir mit *Rhodobacter* und dem Cyanobacterium *Anabaena* PCC7120. Die H_2 - Produktion von *Rhodobacter* geht nicht ausschließlich auf die Photosynthese zurück, sondern teilweise auf organisches Substrat, welches im Medium enthalten ist (Vorbesprechung). Bei *Anabaena* stammt die Energie für die H_2 -Produktion ausschließlich aus der Photosynthese, wegen der geringen H_2 Konzentration ist der Nachweis allerdings unsicher. Es ist wichtig, die grundlegenden Unterschiede zwischen Purpurbakterien, Grünalgen und Cyanobakterien zu verstehen: Der Photosynthese-Apparat ist unterschiedlich aufgebaut und es werden unterschiedliche Pigmente genutzt. Purpurbakterien können zwar Photosynthese betreiben, benötigen aber zusätzlich organische Substrate für ihr Wachstum. Sie sind damit photoorganotroph. Cyanobakterien können (wie auch Algen und Pflanzen) vollständig phototroph wachsen, d. h. ihre Energie entstammt ausschließlich dem Licht (Vorbesprechung).

Im Praktikum geht es außerdem um mikrobiologische Arbeitstechniken, eine Grundlage für das Arbeiten mit Microalgen. Es werden Kulturen überimpft und ihr Wachstum wird nachvollzogen. Dabei ist es wichtig, die verschiedenen Zellformen zu betrachten und die Auswirkungen auf verschiedene Verfahren zur Zellzahlbestimmung zu diskutieren. Der wichtigste Aspekt bei der Energiegewinnung ist die Energieumwandlung in der Photosynthese. Im Praktikum werden Photosynthese Pigmente spektroskopisch untersucht. Außerdem soll in einem einfachen Experiment nachvollzogen werden, wie sich Wachstum und Photosynthese-Pigmente unter verschiedenen Lichtverhältnissen (rot / grün / weiß) unterscheidet.

Versuch 1 – Wachstum

Microalgen wachsen sowohl auf Festmedium als auch in Flüssigmedium. Für größere Mengen werden Flüssigkulturen bevorzugt. Die Microalgen müssen 1 - 2 Wochen unter bestimmten Licht- und Temperaturbedingungen in Flüssig-Medium wachsen. Zur Bestimmung der Zelldichte wird in der Regel die optische Dichte bei 750 oder 780 nm verwendet. Im Kurs werden verschiedene Microalgen kultiviert (siehe Tabelle 1). Am ersten Kurstag werden alle Kulturen in frisches Flüssigmedium überimpft. Durch Zelldichtemessungen am ersten Tag (1. Kurstag) und nach einer Woche (2. Kurstag) wird das Wachstum quantifiziert. Die gleichen Kulturen werden für Mikroskopie (am 1. Kurstag) und für die Aufzeichnung von Absorptionsspektren am Photometer (1. und 2. Kurstag) verwendet.

- Von den Kulturen werden je 2 ml in je 9 ml frisches Medium überführt. Achtung, es sind unterschiedliche Medien (Tab. 2) Wie stark ist die Verdünnung? Schütteln Sie die Kulturen zuvor, um eine möglichst gute Homogenität zu erreichen.
- Die optische Dichte bei 750 nm der neu beimpften Kultur wird als Start-OD und nach einer Woche als End-OD bestimmt.
- Die neu beimpften Kulturen werden im Kulturraum bei 25 °C unter Leuchtstoffröhren (ca. $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) oder roten bzw. grünen LED (Intensität bitte messen) kultiviert.

Tabelle 1: Photometrie

Gruppe	ID	Bezeichnung der Art oder des Stammes	Medium
1	A	<i>Phormidium lacuna</i> HE10JO (für weißes Licht)	f/2
	B	<i>Phormidium lacuna</i> HE10JO (für grünes Licht)	f/2
	C	<i>Synechocystis</i> PCC6803	BG11
	D	<i>Synechocystis</i> petJPDCADH (GVO)	BG11
	E	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	PBM
	F	<i>Synechococcus</i>	BG11
2	G	<i>Phormidium lacuna</i> HE10JO (für rotes Licht)	f/2
	H	<i>Anabaena</i> PCC 7120 (Bg11_0)	BG11:0
	I	<i>Anabaena</i> PCC 7120 (Bg11)	BG11
	J	<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	f/2
	K	<i>Synechocystis</i> petJPDCADH (GVO)	BG11 mit 10 μM Bathocupoin
	L	<i>Cyanotheke</i>	BG11

Für die Auswertung brauchen Sie die beiden $\text{OD}_{750\text{nm}}$ Werte (erste Woche und zweite Woche) für A bis L. Diese müssen im Protokoll dokumentiert werden und werden gleich bei der Abschlussbesprechung ausgewertet. Zu welcher Gruppe (Cyanobakterien, Diatomeen, Grünalgen, Purpurbakterien oder andere) gehören die Organismen? Vergleichen Sie das Wachstum der verschiedenen Organismen.

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 z.B. für die Gewinnung von Biokraftstoffen 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, werden Spektren 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. 1). Da die Zellen Licht streuen, wird im Versuch eine "Ulbrichtkugel" verwendet. Diese minimiert den Verlust des Messlichts, das durch Streuung für die Messung verloren geht.

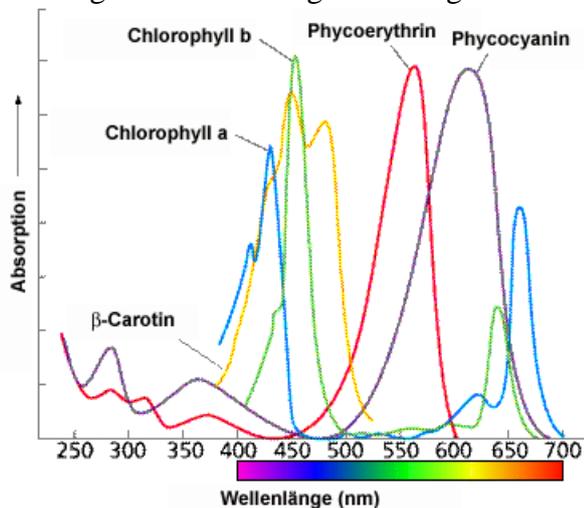


Abbildung 1 A: UV-vis Spektren von Chlorophyll a, b und Phycobiliproteinen

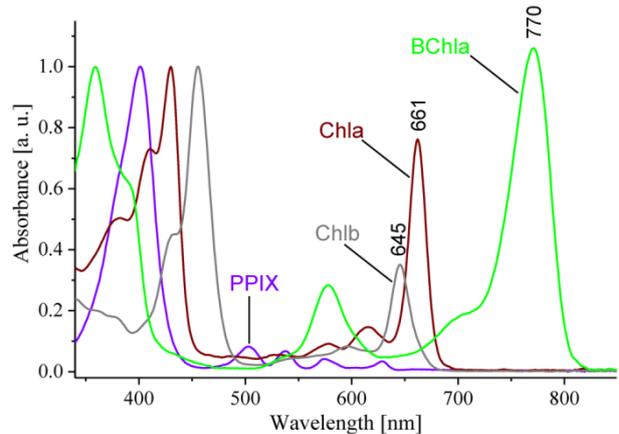


Abbildung 1 B: Spektren von Bacteriochlorophyll und Chlorophyll A, B

<http://www.mdpi.com/1420-3049/19/10/15938/htm>

<http://www.zum.de/Faecher/Materialien/beck/12/bs12-12.htm>

Beachten Sie: Für die Messungen in Versuch 1, in denen die Zelldichte bestimmt werden soll, wird genau diese Streuung genutzt. Für die Messung von Pigmenten soll die Streuung minimiert werden, bei der Zelldichtemessung soll die Absorption von Pigmenten vermieden werden. (Wie wird dies erreicht?) Bestimmen Sie in den gemessenen Spektren für jeden Organismus die Wellenlängen der auffälligsten Minima und die Maxima. (Wegen der Streuung spricht man hier besser nicht von Absorption sondern von optischer Dichte).

- Erste und zweite Woche: es werden von jeder Kultur unter sterilen Bedingungen 1 ml in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert. Am Jasco Photometer wird die Probe in eine spezielle Küvette überführt. Mit Hilfe der Ulbrichtkugel wird das Spektrum von 300 – 900 nm aufgezeichnet. Die Werte der Maxima sollten zwischen 0,1 und 2 liegen.
- Falls die Werte zu hoch sind, muss die Probe zurück in das Eppendorf-Gefäß pipettiert, verdünnt und nochmal gemessen werden. Falls die Werte zu niedrig sind, kann man ggf. die Probe durch Zentrifugation konzentrieren.

Für die Auswertung (Protokoll und Nachbesprechung) brauchen Sie alle Spektren sowie für jeden Organismus die Wellenlängen der Maxima und Schultern und die Zuordnung zu einem Pigment.

Versuch 3 – Mikroskopie

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

Dazu die Proben aus Versuch 2 verwenden. Sie brauchen von jedem Organismus ein gutes Bild. Dieses muss im Protokoll und bei der Abschlussbesprechung gezeigt werden.

- Aus den Proben werden 10 µl Kultur auf einen Objektträger gebracht und ein Deckgläschen aufgelegt (ein Objekt für alle Teilnehmer).
- Am Mikroskop werden nun alle Proben betrachtet. Bitte arbeiten Sie mit maximaler Vergrößerung, ggf. mit Ölimmersion. Filamentöse Cyanobakterien bestehen aus vielen Zellen. Beschreiben Sie Zellform, und Zellgröße sowie ggf. Farbe. Die Größe kann durch das Messokular bestimmt werden.
- 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 (*Neubauer* und *Neubauer improved*) bestimmen. Im Protokoll soll diese Art der Zellzahlbestimmung mit anderen Verfahren verglichen werden.

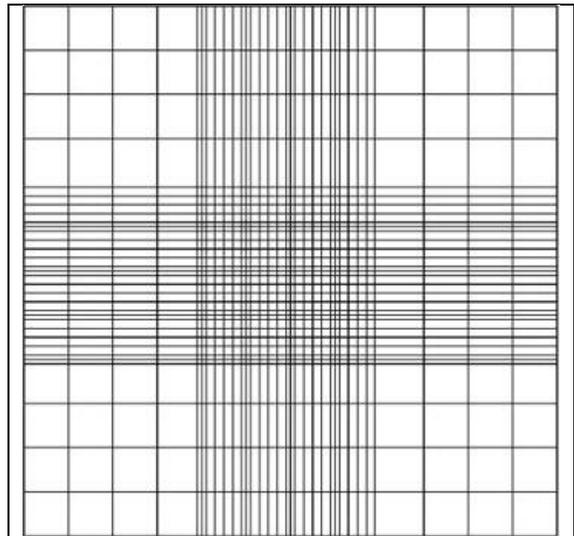


Abbildung 2. Beispiel für Zählkammer ("Neubauer"), Großquadrat 1 mm², Gruppenquadrat 0,04 mm², Kleinstquadrat 0,0025 mm²

<http://www.zaehlkammer.de/deutsch/neubauer.html>

Versuch 4 – Wasserstoffproduktion

Im Kurs wird eine Kultur *Rhodobacter capsulatus* und eine Kultur *Anabaena* PCC7120 angesetzt. Der H₂-Nachweis für *Rhodobacter capsulatus* ist wegen der großen Menge einfach und gelingt fast immer. Bei dem Cyanobakterium *Anabaena* PCC7120 erwartet man geringe Mengen H₂, diese liegen möglicherweise unter der Nachweisgrenze.

Voraussetzung für die H₂-Produktion sind Stickstoffmangel (bei *Anabaena*) sowie anaerobe Bedingungen (bei beiden Arten). 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

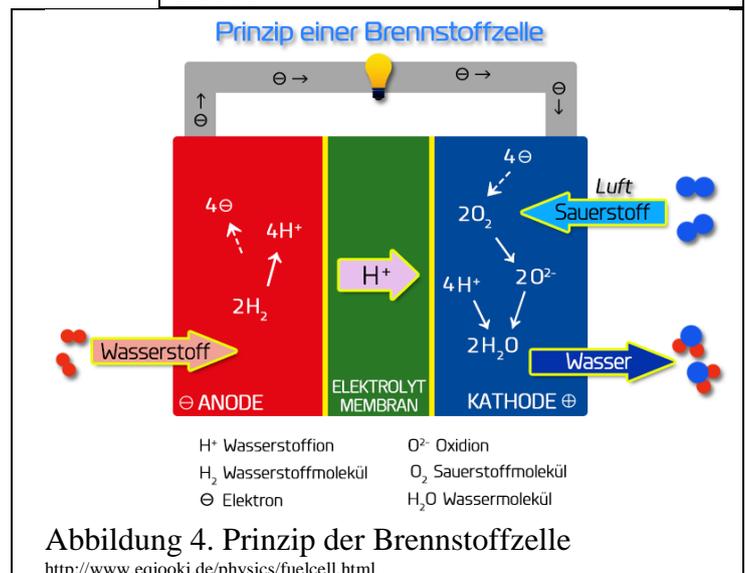
Um eine anhaltende Gasentwicklung sicherzustellen, soll das Kulturvolumen 120 ml betragen und die Start-OD_{700 nm} bei 0,05 liegen.

- 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_{750 nm}.
- Das Gefäß wird randvoll gefüllt und dann 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. (Sofort 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. *Rhodobacter capsulatus* Kultur

- Die andere Seite der Brennstoffzelle bleibt offen. Sie ist daher dem Sauerstoff der Luft ausgesetzt. Die maximal generierbare Spannung (angeschlossenes Voltmeter) wird notiert.
- Eine zweite Probe wird für die 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. Gaschromatographen-Profil und Auswertung werden für Protokoll und Abschlussbesprechung benötigt.



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 sollte allerdings unter schwachem Licht gerührt oder geschüttelt werden. Sie brauchen die gleichen Daten wie beim *Rhodobacter* Versuch.

Tabelle 2: 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 3: Parameter für den Wasserstoffnachweis über Gaschromatographie

Injektion	500 μ l mit 500 μ l Gasspritze
GC	GC Agilent 6890
Detektor	Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD), Temp. 210 °C
Säule	Molekularsieb (HP 19091P-MS7), 15 mm x 0,32 mm x 25 μ m Maximale Temp. 300 °C bei 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 *Synechocystis* petJPDCADH in Kultur D und K kann Ethanol produzieren. Eine der beiden Kulturen enthält 10 μ M Bathocuproin, welches Kupfer bindet. Dies kann zur Aktivierung des Promotor führen, welcher durch Kupfer gehemmt wird. Als dritte Probe wird Kultur B (*Synechocystis* PCC6803) verwendet. In der zweiten Woche von diesen drei Kulturen zweimal je 1 ml abnehmen. Eine der beiden Proben wird mit Hilfe der Frenchpress extrahiert, die andere nicht. Alle sechs Proben werden dann zentrifugiert. Die Überstände werden in ein neues Gefäß überführt.

Für den direkten Vergleich wird eine Verdünnungsreihe mit 0, 0,02, 0,04, 0,06 und 0,1 % unvergälltem Alkohol (Molgew. 46) angesetzt. Für den Versuch werden folgende Reagenzien benötigt:

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

Lösung 1: 751 mg Glycin (Molgew. 75) in 100 ml 100 mM NaOH (Molgew. 40) (ist vorbereitet)

Lösung 2: 0,112 g Semicarbazid-hydrochlorid in 10 ml 100 mM NaOH (vorbereitet)

Reaktionspuffer (70 mM Gly pH 8,6, 10 mM Semicarbazid): 70 ml Lösung 1 und 10 ml Lösung 2 mischen. Mit 100 mM Salzsäure auf pH 8,6 einstellen und auf 100 ml auffüllen. (selbst herstellen)

NAD-Stammlösung: 10 mg NAD (Nicotinamid Adenin Dinucleotid, Molgew. 663) gelöst in 1 ml Reaktionspuffer. (selbst herstellen)

Durchführung

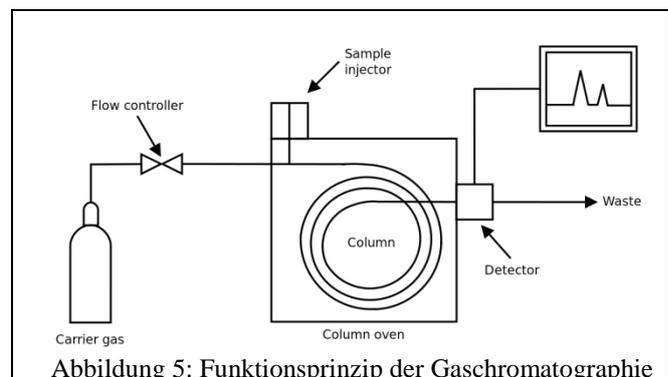


Abbildung 5: Funktionsprinzip der Gaschromatographie

Für diesen Versuch wird der Verlauf der Absorption bei 340 nm (NADH Maximum) gegen die Zeit gemessen. Im Photometer die "time drive" Funktion einstellen und die Wellenlänge auf 340 nm einstellen. In einer Küvette werden 550 µl Reaktionspuffer und 250 µl NAD-Lösung gemischt und 150 µl Probe hinzugefügt. Dann wird die Absorption gemessen und notiert. Nun die „time drive“ Funktion des Photometers starten, die Absorptionswerte werden kontinuierlich aufgezeichnet. Bei laufender Messung 50 µl der ADH-Lösung zumischen (mit 100 µl Pipette für etwa 10 sec alles durchmischen). Aufzeichnung 3 min nach Zugabe von ADH stoppen. Die Werte für 0, 1, 2 und 3 min tabellarisch auswerten. Wie viel Ethanol wurde produziert?

Anhang

Organisation Kursteil Microalgen

Von den Studenten benötigte Utensilien: Deckgläser und Objektträger, USB-Stick

Tag 1

Versuch 1 Wachstum: Kulturen animpfen, Start-OD bestimmen (V1) Pigmente: Bestimmung der Extinktionsspektren (V2) Mikroskopie: Proben nehmen, Objekte am Mikroskop beschreiben, Photos (V3) Wasserstoffproduktion: Kulturen messen, animpfen, „Reaktor“ aufbauen, Start-OD bestimmen (V4)

Zeitlicher Ablauf (Abweichungen sind möglich):

- Einführung / Vorbesprechung
- Die Teilnehmer werden in zwei Gruppen eingeteilt.
- Kulturen nacheinander (aber für die Versuche parallel) an der Sterilbank „verarbeiten“. Jeder Teilnehmer übernimmt eine Kultur (die Betreuer zeigen das Vorgehen ebenfalls an einer Kultur).
- Die Medien PBM, Bg11 und f/2 müssen angesetzt werden. Jede Gruppe rechnet für sich, wie man die Medien ansetzt.
- Jeweils 9 ml Medium vorlegen und mit je 2 ml Vorkultur Animpfen. Proben nehmen je 1 ml jeder Probe für V2 und V3 abzweigen
- OD-Messungen am Photometer für Versuch 1 und Aufzeichnung der Absorptionsspektren am Photometer für V2
- *Rhodobacter*-Kultur und *Anabaena* Kultur für Wasserstoffproduktion ansetzen (evtl. jede Gruppe einen Ansatz)
- Mikroskopie, Ziel ist es u.a. gute Fotos zu machen

Tag 2

Mikroskopie, Photometer Messungen (V1), Spektren für (V2), Wasserstoffmessung (V4), Ethanolmessung (V5), Abschlussbesprechung inkl. Excel Auswertung

Zeitlicher Ablauf:

- Gasproben nehmen (beide Gruppen) (V4)
- Messung des Gases am GC (beide Gruppen) (V4)
- Test des Gases an Brennstoffzelle mit Multimeter (beide Gruppen) (V4)
- Für V1 und V2 je Kultur 1+1 ml in Eppendorf-Gefäß überführen, für V5 ebenfalls je Kultur 1 + 1 ml abnehmen (beide Gruppen). Es kann, muss aber nicht steril gearbeitet werden, daher können Sie parallel arbeiten.
- OD-Messungen am Photometer (V1, wie an Tag 1)
- Vorbereitung Alkohol Messung (beide Gruppen)
- Bestimmung der Alkoholkonzentration am Uvikon Photometer, Spektren am Jasco Photometer (V2)

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 9 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			

Die Stammlösung, der Puffer und die Vitaminlösung müssen so berechnet werden, dass sie im Medium 1-fach konzentriert vorliegen.

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 9 ml
BG-11-Stammlösung (50x konzentriert)	
TES-Stammlösung pH 8 (10x konzentriert)	
Mit doppelt destilliertem Wasser auf Gesamtvolumen auffüllen	

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

Den beiden GVO Kulturen muss Kanamycin beigefügt werden .

Reagenz / Gesamtvolumen	Synechocystis petJPDCADH 100 µg für 9 ml
Kanamycin Stammlösung (50 mg)	

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.**

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 9 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, dass 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) 1ml
 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