



Maintenance of Cultures

Cultures sent to customers remain alive for at least 14 days provided that the following precautions are observed. Cultures should be unpacked immediately after receipt and stored at 15-18°C under low light intensity (north window, no direct sun light, or weak white fluorescent light). Screw caps or vessels should be loosened but not removed. Further maintenance or multiplication of cultures requires transfer into new culture media. This presupposes experience in simple microbial techniques.

Many species are cultivated and dispatched on agar media for safety reasons but develop their morphological characteristics only in liquid media, e.g. flagellates, colony-forming Volvocales and Chlorococcales. For teaching purposes these species should be transferred into liquid media 2-3 weeks before demonstration, e.g. into Soil Water Media, Basal Medium, or Desmidiacean Medium.

Culture Media

The following media have proved suitable for the maintenance of cultures in test tubes at the SAG for many years. The recipes originate from E. G. Pringsheim and W. Koch, unless stated otherwise. It must be emphasized that the maintenance medium indicated is not always the best medium for the cultivation of a species. There are other media which are just as suitable, e.g. those given in the catalogues of other culture collections of algae (Thompson et al., 1988, Watanabe and Nozaki, 1994, Andersen et al., 1991, Rippka and Herdman, 1992, Starr and Zeikus, 1993). Mass algal culture often requires more concentrated media (for recipes and methods consult Kuhl and Lorenzen, 1964; Starr, 1971; Stein, 1973; Guillard, 1975; Werner, 1982; Castenholz, 1988; Richmond, 2004; Andersen, 2005).

All solutions should be made up with de-ionized water. Media are usually prepared from stock solutions of macronutrients, trace metals, and vitamins which are added to a large proportion of the final volume of water in order to avoid precipitation.

Media may be used as liquid or solidified by 1.0-1.5% agar. Before sterilization the agar has to be dissolved in the medium in a steamer. After this test tubes should be filled with 10 ml of the hot medium, closed with cotton plugs, sterilized (usually by autoclaving at 121°C for 15 min.) and may be stored for several weeks, after cooling, in a refrigerator. Solid media for Cyanobacteria are prepared by mixing, after cooling to 50°C, equal volumes of separately autoclaved double strength solutions of the mineral salts medium and either agar to give a final agar concentration of 0.6-1.0 %.

3. Soil Water Media

These media have great advantages for many purposes as long as axenic culture is not required, e.g. for the cultivation of species of which nutrient requirements are not known, or to obtain morphologically normal growth. A more detailed note on biphasic soil water media is found at the end of this recipe.

Preparation: Place 1-2 cm of garden soil (E = garden soil. Modified M = loamy soil; T = peat; S = sand) in the bottom of a test tube (or bottle). The appropriate quality of soil is indicated under medium 1 (Medium "ES": Basal Medium), preparation of soil extract. Fill up with distilled or de-ionized water until the container is 3/4 full and cover with cotton plug. Steam (not autoclave) for 1 h on two consecutive days.

A variety of modifications can be made adding additional materials and using different types of soil. The following types have proved especially suitable:

a) Soil Water Medium with CaCO_3 (=CaE "Calcium + Erdwasser")

A small pinch of powdered CaCO_3 is placed in the bottom of the tube before soil is added.

b) Soil Water Medium with NH_4MgPO_4 (=NH4E)

A small pinch of NH_4MgPO_4 is placed in the bottom of the tube before soil is added.

c) Soil Water Medium with Pea (= ErbsE)

1/8 of a garden pea, soaked 12 h before, is placed in the bottom of the tube before soil is added.

d) Soil Water Medium with Barley (=GerstE)

1/2 of a barley corn previously soaked for 12 h, is placed in the bottom of the tube before soil is added.

e) Soil Water Medium with Wheat (=WeizenE)

1/2 of a wheat corn previously soaked for 12 h, is placed in the bottom of the tube before soil is added.

f) Sandy and Loamy Soil Water Medium with Pea (= ErbsMS)

1/8 of a garden pea, soaked 12 h before, is placed in the bottom of the tube before soil (loamy soil (M) and sand (S) 1:1 is added.

g) Sandy Soil Water Medium with Pea (= ErbsS)

1/8 of a garden pea, soaked 12 h before, is placed in the bottom of the tube before soil (sand, S) is added.



References

- Andersen, R.A.; Jacobson, D.M. & Sexton, J.P. – Provasoli-Guillard Center for Culture of Marine Phytoplankton. Catalogue of Strains. 98pp. West Boothbay Harbor, Maine, USA, 1991.
- Andersen, R.A.; Morton, S. L. & Sexton, J.P. – Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton. 1997 List of Strains. J. Phycol. 33 (suppl): 1-75, 1997.
- Castenholz, R.W. – Culturing methods for Cyanobacteria. In: L. Packer and A.N. Glazer, eds., Cyanobacteria. Methods of Enzymology 167 (1988), 68-93.
- Guillard, R.R.L. – Culture of Phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: W.L. Smith and M. H. Chanley, eds., Culture of marine invertebrate animals. pp.29-60, Plenum Book Publ. Corp., New York, 1975.
- Kuhl, A. & Lorenzen, H. – Handling and culturing of *Chlorella*. In: D.M. Prescott, ed., Methods in cell physiology. Vol.1, pp. 152-187, Academic Press, New York and London, 1964.
- Rippka, R. & Herdman, M. – Pasteur Culture Collection of Cyanobacterial Strains in Axenic Culture. Vol.1, Catalogue of strains. 103pp., Institut Pasteur, Paris, France, 1992.
- Starr, R.C. – Algal Cultures – sources and methods of cultivation. In: A. San Pietro, ed., Photosynthesis. Part A, pp. 29-53, Methods in Enzymology vol. 23, Academic Press, New York, 1971.
- Starr, R.C. & Zeikus, J.A. – UTEX – The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin. J. Phycol. Suppl. 29 (1993).
- Stein, J.R. ed. – Handbook of phycological methods. Culture Methods and growth measurements, pp. 448, Cambridge at the University Press, London, New York, 1973.
- Thompson, A.S.; Rhodes, J.C. & Pettman, I. – Culture Collection of Algae and Protozoa. Catalogue of strains. 164pp., Natural Environment Research and Council, England, 5th edit., 1988.
- Watanabe, M.M. & Nozaki, H. – NIES-Collection. List of strains, microalgae and protozoa. 4th edit., 127pp. The National Institute for Environmental Studies, Japan, 1994.
- Werner, D. – Biologische Versuchsobjekte. Kultivierung und Wachstum ausgewählter Versuchsorganismen in definierten Medien. 432pp. Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1982.

Further recommended literature about culturing algae:

- Andersen, R.A. (ed.) (2005) Algal Culturing Techniques. Elsevier Academic Press, Burlington.
ISBN 0-12-088426-7.**
- Belcher & Swale (1982) Culturing Algae - a guide for schools and colleges.
ISBN 1-871105-04-8 (ask for at ccap@sams.ac.uk). (Currently unavailable).
- Isaac & Jennings (1995) Microbial Culture. Bios Scientific Publ., Oxford.
ISBN 1-872748-92-9.**
- Richmond (ed.) (2004) Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Publ., London. ISBN 0-632-05953-2.**
- Streble & Krauter (2006) Das Leben im Wassertropfen. Kosmos (Franckh-Kosmos), Stuttgart.
ISBN 3-440-10807-4.
- Von Berg, Linne & Melkonian (2004) Der Kosmos-Algenführer. Kosmos (Franckh-Kosmos), Stuttgart.
ISBN 3-440-09719-6.



Note on biphasic soil-water media

Biphasic soil water-media may be **advantageous for healthy growth over long periods of time** for non-axenic strains, in particular for filamentous green algae and euglenoids. The **addition of soil extract often helps to achieve the typical morphology best** (e.g. in coccoid green algae) whereas the cells on the same medium without soil extract tend to accumulate starch or oil droplets. Some strains (e.g. some colourless euglenoids) cannot be grown in defined media, but only in soil-water media. Important criteria for the selection of soil include that it must not contain artificial or natural manure and dung, just old garden soil with a little sand, soil from mature compost or decayed leafs is well suited. The **limitation of soil-water media** is that they are not suited to maintain axenic cultures because they cannot be autoclaved. Instead, soil and water are only cooked in a steam pot repeated times so that bacteria which are needed to supply the water phase with nutrients by their slow decay of organic compounds in the soil can survive. In biphasic soil-water media the growth of bacteria is often promoted by the addition of organic matter, e.g. one eighth of a pea or half a wheat corn, to achieve a constant nutrient supply.

A text with more details on how to use and prepare soil-water media is following on the next pages (in German only)!

Erde-Wasser-Kultur (nach E.G. Pringsheim)

Prinzip: Es handelt sich um die Nachahmung eines natürlichen Gewässers. In einem Glasgefäß steht Wasser über wenig Erde, der evtl. etwas schwerlösliche organische oder anorganische Substanz zugesetzt ist. Das Medium wird mit einer Algenart beimpft. Die Erde wirkt als Speicher; sie liefert mineralische Nährstoffe und enthält Bakterien, die organische Substanz in der festen Phase langsam abbauen und so niedermolekulare organische Nährstoffe und Wachstumsregulatoren für die Algen produzieren, welche allmählich in die flüssige Phase diffundieren. Vor allem fördern die Erdkolloide das Algenwachstum; dies wird auf deren Komplexbildung, Austauschwirkung und Adsorptionsfähigkeit zurückgeführt, wodurch leicht fällbare Nährelemente verfügbar gehalten und evtl. entstehende Hemmstoffe fixiert werden können.

Wozu ? Erde-Wassermedien ermöglichen Algenkultur mit einfachsten Mitteln. Manche Art lässt sich bisher nur in solchen biphasischen, nährstoffarmen und komplexen Medien kultivieren, weil geeignete definierte Medien nicht bekannt sind. Viele Einzeller und Zellverbände bilden in diesen naturnahen Medien ihre artspezifische Morphologie eher aus oder sind leichter zur Fortpflanzung, vor allem zu sexueller Reproduktion zu bringen als in synthetischen Nährlösungen. Unialgale Erde-Wasser-Kulturen, in denen Antagonisten und Konkurrenten abwesend sind, eignen sich deshalb besonders zur Anzucht von Material für morphologisch-entwicklungsgeschichtliche Kurse. Manche Arten, die in mineralischen Nährlösungen einige Wochen gedeihen, lassen sich in Erde-Wassermedien monatelang erhalten, wenn die Kulturen nicht zu warm (um 15°C) und zu hell (am Nordfenster) aufbewahrt werden. Weil sich damit Algen langfristig im naturnahen Zustand erhalten lassen und sie für sehr viele Arten von Mikroalgen verwendbar sind, eignen sich Erde-Wassermedien zum Erhalt von Isolaten in Kultursammlungen. Algen, deren Artzugehörigkeit in Naturproben nicht zu identifizieren ist, weil diese zu wenig Material enthalten oder charakteristische Entwicklungsstadien fehlen, lassen sich nach isolierter Anreicherung in Erde-Wasser-Kultur bestimmen. Einige rare Flagellaten, wie pigmentlose Euglenophyceen, sind nur mittels dieser Anreicherung entdeckt worden. Ausgehend vom vermehrten Material einer Art in solchen Anreicherungskulturen kann man Reinkulturen isolieren; diese sind genetisch einheitlich, weil von einer Zelle oder einem Fragment ausgehend und axenisch, d.h. frei von anderen Organismen. Reinkulturen sind unentbehrlich für die Grundlagenforschung



Ansatz von Erde-Wassermedien. Zur Kultur im Reagenzglas gibt man gegebenenfalls zunächst eine geringe Menge schwer löslicher organischer oder anorganischer Substanz in das Röhrchen, füllt darüber 1 bis max. 2 cm Erde und überschichtet bis max. 5 cm unter dem Rand mit Wasser, verschließt mit Wattestopfen und kocht 2x 1h im Abstand von 24h im Dampftopf. Dabei gehen Erdkolloide in Lösung, und alle enthaltenen Algen, Pilze und Tiere werden abgetötet. Nur wenige, meist sporenbildende Bodenbakterien überstehen die Behandlung, welche die organischen Substanzen langsam abbauen. Es ist wichtig, dass Erde-Wassermedien nicht autoklaviert werden, damit diese Bakterien erhalten bleiben. Der Ansatz sollte nur wenig organische Substanz enthalten, damit nicht ein zu üppiges Wachstum von Bakterien die Algenentwicklung hemmt.

Für längere Kultur und zur Anzucht von mehr Algenmaterial kann man größere Glasgefäße mit entsprechender Füllung verwenden, z.B. hohe Petrischalen, Joghurt- und Marmeladengläser oder kleine Milchflaschen, die mit Petrischalendeckeln passender Größe abgedeckt sind.

Rezepte. Je nach beigelegtem Material, durch Einsatz verschiedener Erden und unterschiedlichem Wasser lassen sich zahlreiche Modifikationen von Erde-Wassermedien herstellen, die jeweils für bestimmte Algenarten geeignet sein können.

Als organische Zusätze sind pro Reagenzglas z.B. verwendet worden: Teile von gequollenen Weizen-, Reis- und Erbsensamen, eine kleine Spatelspitze Stärke, ein kleines Stückchen Käse, Fibrin oder Gelatine und als Quelle von Nährelementen NH_4MgPO_4 . Leichtlösliche Substanzen sind nicht zu empfehlen, weil sie das Medium nährstoffreich machen, was viele Arten nicht vertragen. Manche Arten wachsen eher in Erde-Wassermedien ohne Zusätze.

Das reiche Spektrum natürlicher Erden bietet viele mögliche Varianten. Erfahrungsgemäß sind alte, etwas sandige Gartenerden und mehrere Jahre gereifte Kompost- und Lauberden, die frei von mineralischem Dünger und Pflanzenschutzmitteln sind, besonders geeignet. Solche Erden lassen sich luftgetrocknet bis zum Gebrauch wochenlang verfügbar halten. Durch Mischen von Erde mit altem Torf oder Einsatz von Torf anstelle von Erde erhält man Medien für Arten aus saurem Milieu. Ein schwach alkalisches Milieu erreicht man durch Zusatz einer kleinen Spatelspitze CaCO_3 .

Verschiedene Wasser lassen sich einsetzen:

natürliches Süßwasser aus Bächen und Seen, Mineralwasser, Leitungswasser (das frei von Cl^- und Cu_2^+ sein muss), Aqua dest. oder natürliches Meerwasser zur Kultur mariner Algen. Wir verwenden generell entionisiertes Leitungswasser für Süßwasseralgen.

Im Betrieb der Kultursammlung haben sich die folgenden Rezepte bewährt:

Erbs E, Erbs S, Erbs MS: auf 1/8 (nicht mehr!) eines vorher 12h gequollenen Erbsensamens wird ca. 2 cm alte Komposterde (**Erbs E**) oder Sand (**Erbs S**) oder zuerst Lehm und darüber Sand (**Erbs MS**) gefüllt und mit Wasser überschichtet.

Weizen E: über 1/2 gequollenes Weizenkorn wird alte Komposterde geschichtet.

NH₄E: eine kleine Spatelspitze NH_4MgPO_4 wird mit alter Komposterde überschichtet.

CaE: auf eine kleine Spatelspitze CaCO_3 ; wird alte Komposterde geschichtet.

Für welche Algen geeignet ? Arten mit verschiedensten Ansprüchen lassen sich in Erde-Wassermedien kultivieren: C-photoautotrophe und C-heterotrophe, eu- und oligotrophe, osmo- und phagotrophe, aus saurem oder alkalischem Milieu, Süßwasser- oder marine Sippen. Wahrscheinlich gedeihen die meisten Arten darin - bei geeigneter Zusammensetzung des Mediums. Verschiedene Arten einer Gattung erfordern, entsprechend ihren unterschiedlichen natürlichen Habitaten, oft verschiedene Medien. Man muß probieren. Hier nur exemplarisch einige Beispiele von Gattungen und dafür bewährte Medien.

Grüne Euglenophyta wie *Euglena*, *Lepocinclis*, *Phacus*, *Trachelomonas*: **NH₄E, Erbs MS, Erbs S, Weizen E**

C-heterotrophe, pigmentlose Gattungen von Euglenophyta wie *Astasia*, *Cyclidiopsis*, *Distigma*, *Gyropaigne*, *Hyalophacus*, *Khawkinea*, *Menoidium*, *Parmidium*, von Cryptophyta wie *Chilomonas* und von Chlorophyta wie *Hyalogonium*, *Polytoma*, *Polytomella*: **Erbs S, Erbs MS, Erbs E, Weizen E;**

Chlorophyta, die mit organischen Zusätzen wachsen wie *Astrephomene* und *Pyrobotrys*: **Erbs E + CaCO₃;**

C-photoautotrophe Chlorophyta wie *Botryococcus*, *Bulbochaete*, *Chlorogonium*, *Oedogonium*, *Oocystis*, *Spirogyra*, *Ulothrix*, *Zygonema*: Erde ohne Zusätze, **Ca E, NH₄ E** oder **NH₄ E + CaCO₃.**

U.G. Schlösser September 2003