



Isolation / Gewinnung von Purpurbakterien

Es besteht die Möglichkeit, einen Bakterienstamm als Reinkultur direkt bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen in Braunschweig (<http://www.dsmz.de/>, Strain No. 9483, <http://www.dsmz.de/strains/no009483.htm>) zu bestellen.

Selbstverständlich kann auch ein „eigener“ Wildstamm isoliert und zur Wasserstoffproduktion eingesetzt werden. Da Purpurbakterien in nahezu jedem stehenden Süßgewässer vorkommen ist die Isolation nicht sonderlich kompliziert.

Material:

- Ca. 10-20 ml Wasserprobe (Ufer Tiefe von ca. 10-20 cm oberhalb der Faulschlammzone)
- 4 Erlenmeyerkolben mit Schraubverschluss 250 ml (EK250) mit steriler Nährlösung (vgl. Tabelle 1)
- 1 Erlenmeyerkolben mit Schraubverschluss 100 ml (EK100) mit steriler Nährlösung (vgl. Tabelle 1)
- 1 Impföse ca. 2,5 mm
- Agar für die Mikrobiologie (Pulver)
- 1 30 ml Reagenzglas
- 1 Wattestopfen für Reagenzglas
- Alufolie
- Glühlampen
- 1 Skalpell oder scharfes Messer
- 1 Schnellkochtopf
- 1 Blech ca. 30x30 cm
- 1 Bunsenbrenner

Von der Wasserprobe werden ca. 10 ml in einen EK250 gegeben und dieser anschließend verschlossen. Es ist darauf zu achten, dass ein Gasaustausch mit der Umgebung stattfinden kann – der Schraubverschluss also ein wenig gelockert ist –, da bei einsetzender Wasserstoffproduktion bei fest verschlossenem EK ein enormer Innendruck im Kolben entsteht. Anschließend stellt man den EK in einem Abstand von ca. 20-30 cm vor 1-2 Glühlampen. Nach 2-4 Tagen sollte sich eine bräunlich/orange Färbung der Suspension einstellen.

Nun überimpft man mit der abgeflammt Impföse eine geringe Menge dieser ersten Anreicherungskultur auf einen weiteren, mit Nährlösung befüllten, EK250 – auch diesen stellt man anschließend mehrere Tage unter Glühlicht. Nachdem hier ebenfalls sichtbar Bakterien hochgewachsen sind und sich die o.g. Färbung eingestellt hat, wird die Anreicherungsprozedur mit dem dritten EK250 letztmalig durchlaufen. Nach drei Anreicherungen sind in dem letzten der drei bislang verwendeten EK250 bereits überwiegend Purpurbakterien enthalten. Schon hiermit könnten erste Wasserstoffproduktionsversuche unternommen werden (vgl. Abbildung 1).

Möchte man jedoch eine Reinkultur erhalten, was insbesondere beim Einsatz einer Brennstoffzelle empfohlen wird (vgl. Anschluss einer Brennstoffzelle), sind weitere Reinigungsschritte unerlässlich. Hierzu werden 30 ml Nährlösung in ein 30 ml Reagenzglas gegeben und die für festen Agar notwendige Menge Agarpulver hinzugegeben (meist ca. 15g/l), das Reagenzglas anschließend mit Alufolie fest verschlossen und ca. 15 Minuten im Schnellkochtopf gekocht.



Während die noch flüssige Agar/Nährlösungsmischung abkühlt (ACHTUNG nicht unter 40°C aber auch nicht über 42°C !) wird mit der Impföse (abgeflammt) ein Teil der letzten Anreicherungskultur auf den EK100 überimpft, dieser fest verschlossen und geschüttelt und anschließend mit der erneut abgeflamten Impföse aus dem EK100 eine geringe Menge Purpurbakterien in den 40°C-42°C warmen flüssigen Agar gegeben. Das Agar-Reagenzglas wird wieder fest mit Alufolie verschlossen, kurz geschüttelt, bis zur Verfestigung auskühlen gelassen und danach mit dem Wattestopfen verschlossen.

Bereits nach einigen Tagen sind in dem mit Glühlicht im Abstand von ca. 30 cm beleuchteten Reagenzglas, kleine farbige (Zell)Inseln zu erkennen. 1-2 dieser Zellhaufen können mit einem sterilen, abgeflamten Skalpell nach Zerstörung des Reagenzglases auf steriler Unterlage (abgeflammtes Metallblech) herausgeschnitten und erneut in einem EK250 mit Nährlösung zum heranwachsen gegeben werden – die Reinkultur.

Produktionsversuche

Soll herausgefunden werden „wie gut“ ein Bakterienstamm ist, kann mit folgender Messeinrichtung die produzierte Gasmenge bestimmt werden.

Material:

- 1 Messzylinder 500 ml
- 1 Silikonstopfen mit Bohrung
- 1 100 ml Reagenzglas
- 1 Wanne
- Trinkwasser
- 1 Silikonschlauch 2-3mm Durchmesser
- Haltevorrichtung für Reagenzglas

Aufbau:

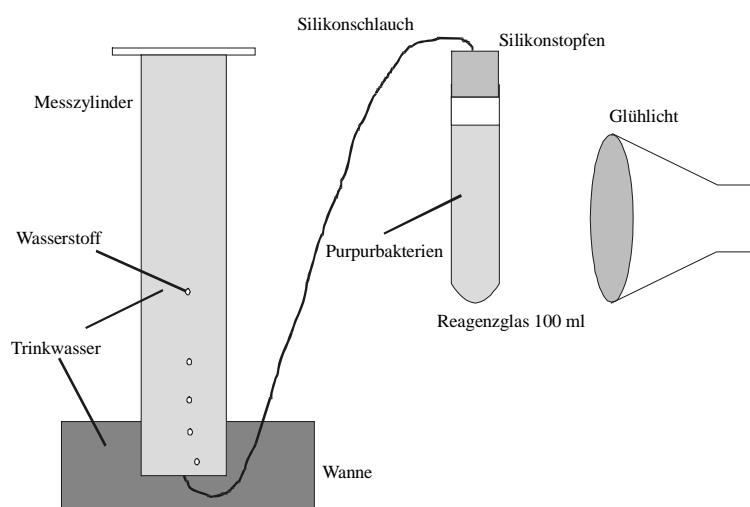
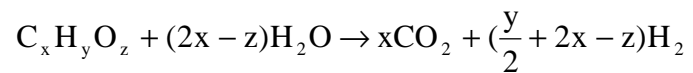


Abbildung 1: Messeinrichtung zur Bestimmung der produzierten Gasmenge



Der Messzylinder wird evakuiert, so dass die Sperrflüssigkeit (Trinkwasser) in den Zylinder nachströmen kann. Das aus dem (mit dem Silikonstopfen verschlossenen) Reagenzglas strömende Produktgas wird von unten in den Messzylinder geleitet. Durch den in den Zylinder perlenden Wasserstoff wird die Sperrflüssigkeit verdrängt und so die produzierte Gasmenge direkt ablesbar. Gemäß nachstehender Bruttoreaktionsgleichung (vgl. Gleichung 1) kann die maximal zu erwartende Menge an Produktgas ermittelt werden.

Gleichung 1



($C_x H_y O_z$: Summenformel der Kohlehydratquelle in der Nährlösung)

Die produzierte Gasmenge liegt bei einem 100 ml Reagenzglas bei Verwendung der Standardnährlösung bei maximal ca. 600 ml in einem Zeitraum von 5-6 Tagen.

Anschluss einer Brennstoffzelle

Material:

- Beispielsweise Brennstoffzelle BZ12/16 (1 Watt) <http://www.conrad.de> zusätzlich ggf. Kleinverbraucher
- 2 Laborflaschen á 2 ltr.
- Silikonstopfen für Laborflaschen
- Glühlampen
- Silikonschlauch

Aufbau:

Der Aufbau ist vergleichbar dem der Produktionsmessung (vgl. Abbildung 1). Anstelle des Messzylinders wird die Brennstoffzelle angeschlossen (vgl. Abbildung 2). Es empfiehlt sich, das Produktionsvolumen (Nährlösungsmenge) auf 4 Liter zu erhöhen.

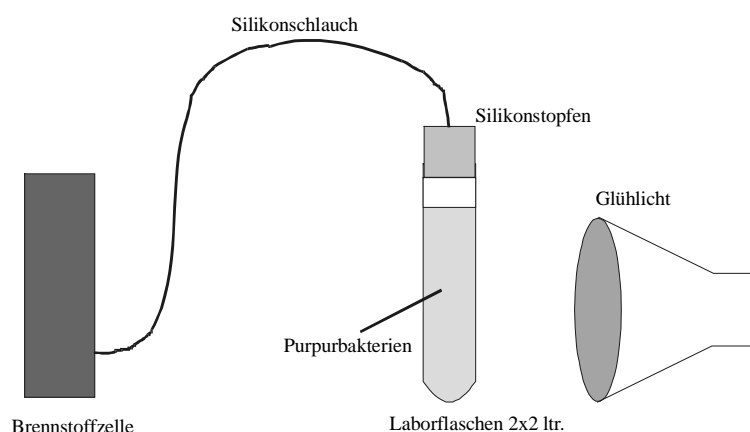


Abbildung 2: Anschluss einer Brennstoffzelle an die bakterielle Wasserstoffproduktion



Standardnährlösung für Purpurbakterien (Konzentrat)

		Menge bei 10 Liter Konzentrat [g]	Menge bei 25 Liter Konzentrat [g]
Milchsäure (90%)	$C_3H_6O_3$	400	1000
L-Glutaminsäure	$C_5H_9NO_4$	103	257,5
Magnesiumsulfat-heptahydrat	$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	20	50
Calciumchlorid-2-hydrat	$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	7,5	18,75
Di-Kaliumhydrogenphosphat	K_2HPO_4	90	225
Kaliumdihydrogenphosphat	KH_2PO_4	60	150
Thiaminiumdichlorid	$C_{12}H_{18}Cl_2N_4OS \cdot xH_2O$	0,1	0,25
Nicotinsäure	$C_6H_5NO_2$	0,1	0,25
4-Aminobenzoessäure	$C_7H_7NO_2$	0,02	0,05
Biotin	$C_{10}H_{16}N_2O_3S$	0,0015	0,00375
Spurenelementlösung			
Ethylendinitrilotetraessigsäure Natriumeisen(III)-salz-Trihydrat	$C_{10}H_{12}FeN_2NaO_8 \cdot 3 H_2O$	3,2	8,0
Mangan(II)-chlorid	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,04	0,1
Kobalt(II)-chlorid	$CoCl_2 \cdot 6 H_2O$	0,016	0,04
Kupfer(II)-sulfat	$CuSO_4$	0,004	0,01
Natriummolybdat	$Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$	0,012	0,03
Zinkchlorid	$ZnCl_2$	0,008	0,02
Lithiumchlorid	$LiCl$	0,002	0,005
Zinn(II)-chlorid	$SnCl_2 \cdot 2 H_2O$	0,002	0,005
Borsäure	H_3BO_3	0,004	0,01
Kaliumbromid	KBr	0,008	0,02
Kaliumjodid	KJ	0,008	0,02
Bariumchlorid	$BaCl_2 \cdot 2 H_2O$	0,002	0,005

Ad 10 l bzw. 25 l aqua dest.

Tabelle 1: Nährlösung Purpurbakterien

Konzentrat vor Anwendung mit entsprechender Menge H_2O_{dest} verdünnen (aus 10 l Konzentrat werden so 100 l Nährlösung). Neutralisation mit NaOH auf pH 7,4+-0,2 nicht vergessen. Anschließend in Anzuchtgefäß (Erlenmeyerkolben, Reagenzglas, Laborflasche o.ä.) umfüllen und 20 min bei 121°C autoklavieren/ (im Notfall geht auch ein alter Schnellkochtopf). Auf Raumtemperatur abkühlen lassen und mit Bakterien beimpfen. Bei der Anzucht immer die Abdeckung des Anzuchtgefäßes leicht geöffnet lassen, damit der produzierte Wasserstoff abziehen kann.