

## Protocol overenten naar grote startculturen

Er worden 3 L erlenmeyers gebruikt om de grote culturen te kweken. Deze culturen worden gehouden in de precultuurkamer onder een lichtintensiteit van 2000 luxes (per lamp) en kamertemperatuur van 19°C. Als inoculum voor deze grote startculturen worden kleine startculturen van 100 ml gebruikt die niet ouder zijn dan 14 dagen.

- 1) De eerste stap is het ontsmetten van de werkplek en handen. Een kleine hoeveelheid Ethanol 70% wordt gegoten over alle oppervlaktes die in aanraking komen met het materiaal dat gebruikt wordt om de algenculturen te maken. De handen worden ontsmet door ze te wassen met een beetje ethanol.
- 2) De erlenmeyer wordt gevuld met 2,5 L gefiltreerd zeewater (1 µm filter, UV licht bestraald) en bedekt met aluminiumfolie en geïncubeerd in de autoclaaf bij 120°C gedurende 30-45 min.
- 3) Van de kleine startcultuur die gebruikt worden als inoculum worden monsters genomen en onder de microscoop geplaatst. De staat van de culturen wordt gecontroleerd: is vorm van de cellen goed,
- 4) de activiteit van de cellen in het geval van flagellaten voldoende en ontbreekt elke vorm van contaminatie. Alleen goede culturen worden gebruikt.
- 5) Na verwijdering van de aluminiumolie wordt de hals van de erlenmeyer door de blauwe vlam van de brander gehaald. 2,5 ml van Walne medium en 250 µl vitamine-oplossing worden gepipetteerd in de erlenmeyer. Bij diatomeeën wordt ook 10 ml silicaatoplossing toegevoegd.
- 6) 200-300 ml kleine startcultuur wordt overgebracht in de grote startcultuur.
- 7) De hals van de erlenmeyer wordt door de blauwe vlam gehaald, dan wordt een steriele plastic 2 ml de pipet toegevoegd voor de beluchting en de erlenmeyer bedekt met parafilm.
- 8) De nieuwe erlenmeyer wordt gelabeld met de datum van inoculatie en de naam van de algensoort.
- 9) Deze culturen worden belucht (de lucht wordt ook gefiltreerd door een 1 µm membraan filter).
- 10) De lege erlenmeyers worden gewassen met een peroxide-oplossing en hierna afgespoeld met demi water. Ze worden vervolgens gevuld met gefiltreerd zeewater, geautoclaveerd en zijn hierna klaar om opnieuw gebruikt te worden.

Bron: Pauline Kamermans, Mascha Dedert, Henrice Jansen, Tim Schellekens & Aad Smaal (2012) Zeeuwse Tong Werkpakket 2. Schelpdieren: groei en gedrag van schelpdieren in vijverteelt; resultaten 2012.