

Izolacija i identifikacija magnetotaksičnih bakterija iz sedimenta akvatičnih ekosistema

Magnetotaksične bakterije (MTB) su Gram negativne, pokretne bakterije koje su ubikvisti akvatičnih sistema. Naseljavaju zonu prelaza oksično/anoksično i anoksičnu zonu. MTB sintetišu intracelularne kristale gvožđe-oksida i/ili gvožđe-sulfida koji čine magnetozome, strukture koje služe za orijentisanje u geomagnetnom polju Zemlje. MTB se mogu izolovati iz prirode, ali se teško održavaju u kulturi, s obzirom na mikroaerofilni/anaerobni način života, te su zbog toga nedovoljno istražene. Imaju veliki potencijal za primenu u biotehnologiji i drugim primenjenim naukama. Cilj ovog istraživanja je izolacija i identifikacija magnetotaksičnih bakterija iz morskih i slatkovodnih ekosistema. Uzorkovanje je vršeno na marinskim lokalitetima: laguna Amagerstrand i kanal Stadsgaven (Kopenhagen, Danska) i slatkovodnim: Duna-vac kod Opova, močvare u Barandi i Carska bara (Srbija). Nakon izolacije, uzorci su zasejani na hranljive podloge, a izrasle kulture su mikroskopirane metodom viseće kapi uz proveru usmerenog kretanja bakterija ka polovima magneteta. Prisustvo bakterija koje se usmereno kreću u magnetnom polju je konstatovano u uzorcima sa lokaliteta Carska bara (severno- i južno-plivajuće), laguna Amagerstrand i kanal Stadsgaven u Kopenhagenu (severno-plivajuće). Iz uzoraka kod kojih je konstatovano usmereno kretanje bakterija, izolovana je DNK i poslata na analizu sekvence 16S rRNK (MacroGen Inc. Holandija) radi identifikacije. Identifikovane vrste nisu magnetotaksične, ali su dominantne vrste u vodenim staništima, pa je pretpostavka da su maskirale prisustvo MTB.

Uvod

Magnetotaksične bakterije (MTB) su Gram negativne pokretne bakterije koje sintetišu unutarćelijske kristale gvožđe-oksida i/ili gvožđe-sulfida. Kristali gvožđe-oksida i gvožđe-sulfida formiraju nizove koji su označeni kao magnetozomi. Veličina magnetozoma varira u opsegu od 35 do 120 nm (Dworkin *et al.* 2006). Organizacija magnetozoma i kristalne strukture u okviru njih se jasno uočavaju pomoću transmisionog i skenirajućeg elektronskog mikroskopa. Zbog prisustva magnetozoma, magnetotaksične bakterije se orijentišu pomoću geomagnetnog polja Zemlje. MTB žive u sedimentu akvatičnih ekosistema na dubini od nekoliko centimetara, kao mikroaerofili ili fakultativni anaerobi (Dworkin *et al.* 2006). Prisustvo redukovano gvožđa u sedimentu je od značaja za ove bakterije (Stolz 1993), kao i prisustvo sumpora, ukoliko su u pitanju sumpor-redukujuće vrste.

Pojava orijentisanja i usmerenog kretanja ovih bakterija u odnosu na magnetno polje nazvana je magnetotaksija. Pored magnetotaksije, MTB pokazuju i različite oblike hemotaksije, kao što je aerotaksija, pa je njihovo kretanje nazvano magneto-aerotaksija. Postoje dva načina na koji se različite MTB kreću kroz oksično-anoksičnu zonu stratifikovanih akvatičnih sredina i to su polarni i aksijalni. Razlika između ova dva načina kretanja je da se polarne MTB pri promeni smera magnetnog polja ne okreću oko svoje ose već nastavljaju kretanje u drugu stranu, dok se aksijalne okrenu za 180° i nastave kretanje uvek istom stranom tela (Dworkin *et al.* 2006).

MTB je moguće izolovati, ali se teško održavaju u kulturi, s obzirom na način života, koji najčešće zahteva specifičan kiseonični gradijent, te su zbog toga nedovoljno istražene. Sve opisane vrste MTB su ili mikroaerofili ili anaerobi, ili fakultativni anaerobi. Vrste koje spadaju u klase Alfa- i Gama-proteobakterija su uglavnom

Silvija Milosavljević (1996), Beograd, Lješka 57, učenica 4. razreda Trinaeste beogradske gimnazije

MENTOR: Petar Čuček, Znanstveno edukacijski centar Višnjani

mikroaerofili koji se hrane hemolitoautotrofno, koristeći jedinjenja redukovanog sumpora, ili hemoorganoheterotrofno, koristeći organske kiseline. Vrste koje spadaju u klasu Delta-proteobakterija su najčešće anaerobi koji redukuju sulfate i hrane se hemoorganoheterotrofno. Takođe, skoro sve poznate vrste MTB pokazuju sposobnost fiksacije azota, a mnoge i sposobnost denitrifikacije. Iz navedenog se može zaključiti da MTB potencijalno imaju veliku ulogu u biogeohemijskim ciklusima gvožđa, azota, sumpora i ugljenika (Lefevre i Bazylinski 2013).

Filogenetski gledano, ove bakterije pripadaju delta- i alfa-proteo bakterijama, a utvrđeno je i da su neke vrste srodne grupi *Nitrospira* (Dworkin *et al.* 2006).

MTB su morfološki raznovrsne, mogu biti koke, spirili, ovalnog oblika, štapičaste, a opisane su čak i višćelijske forme loptastog oblika (Yan *et al.* 2012).

Opisano je nekoliko metoda za izolaciju MTB, a sve se baziraju na magnetotaksiji ovih bakterija. Najčešće korišćena metoda je metoda kapilarnog trkališta (engl. capillary racetrack), a koristi se i tzv. MTB-zamka (MTB-trap) (Jogler *et al.* 2009).

Nekoliko hranljivih podloga se koristi za gajenje MTB. Međutim, ni jedna od njih nije diferencijalna ili selektivna podloga za MTB, već su definisane tako da sadrže optimalne količine gvožđa, a pored toga i druge mineralne soli i vitamine koji su potrebni za rast i većine drugih bakterija. Važno je da se u hranljivim podlogama za MTB simuliraju uslovi oksično-anoksične tranzicione zone, koja je tipična životna sredina ovih bakterija. Taj efekat se postiže polučvrstim podlogama u koje se dodaju redukujuća jedinjenja kako bi se obezbedili mikroaerofilni uslovi, odnosno da bi se dobila podloga sa koncentracionim gradijentom kiseonika.

Iako su još uvek nedovoljno istražene, magnetotaksične bakterije imaju veliki potencijal za primenu u nauci. MTB se mogu koristiti u ispitivanju magnetnih osobina meteorita i stena, kao i u detekciji magnetno označenih ćelija i nanočestica. Ove bakterije mogle bi biti značajne kao indikatori koncentracije kiseonika u sedimentu i vodi, kao i prečišćivači otpadnih voda magnetnom separacijom, odnosno odstranjivanjem teških metala i radionuklida. MTB se mogu koristiti kao svojevrsni nanoroboti, odnosno mogu se pomerati prema zadatom magnetnom polju i time se

može vršiti usmereni transport nanočestica, što bi moglo imati primenu i u ciljanom lečenju bolesti poput solidnih karcinoma, pri čemu bi imale ulogu nosioca lekova. Poseban značaj mogu imati magnetozomi koje je moguće inkorporirati u eukariotske ćelije, a zatim na njih delovati spoljašnjim magnetnim poljem. Takođe, magnetozomi su korišćeni kao kontrastno sredstvo za MRI, a od velikog značaja su za istraživanja na poljima geologije, paleontologije i astrobiologije (Yan *et al.* 2012). Cilj ovog istraživanja bila je izolacija magnetotaksičnih bakterija iz morskih i slatkovodnih ekosistema i njihova identifikacija.

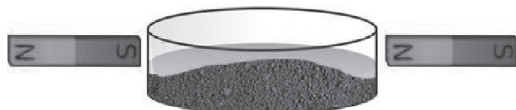
Materijal i metode

Uzorkovanje vode i sedimenta. Na osnovu literaturnih opisa staništa MTB odabrani su lokaliteti za uzorkovanje vode i sedimenta. Uzorkovano je sa lokaliteta laguna Amagerstrand i kanal Stadsgaven u Kristijaniji u Kopenhagenu u Danskoj i iz slatkovodnih ekosistema Dunavac kod Opova, močvara u Barandi i Carska bara u Srbiji. Glavne karakteristike lokaliteta date su u tabeli 1.

Uzorkovanje je vršeno sterilno tako što su sterilne boce za uzorkovanje prvo zaronjene u vodu a potom otvorene i napunjene pomoću sterilne kašike.

Izolacija MT bakterija iz uzoraka. Uzorci su čuvani nekoliko dana u mračnoj prostoriji na temperaturi 20–23°C kako bi se uspostavila oksično-anoksična zona koja je narušena prilikom uzorkovanja i transporta.

Primarno obogaćivanje je izvršeno postavljanjem feritnih magneta oko bočica sa uzorcima, na visini prelaza između nataloženog sedimenta i vode, kao što je prikazano na slici 1. Nakon 24 h obogaćivanja, uzorak koji se nalazio oko magneta je pipetom prenet na sekundarno obogaćivanje.

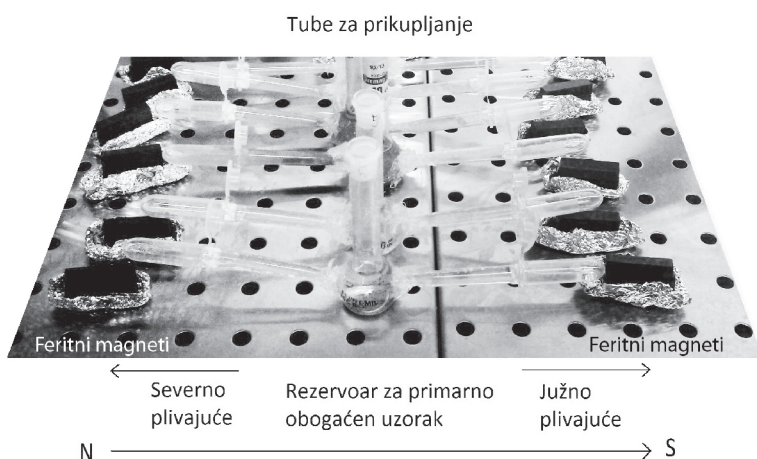


Slika 1. Shematski prikaz metode primarnog obogaćivanja

Figure 1. Schematic representation of the methods of primary enrichment

Tabela 1. Prikaz glavnih karakteristika lokaliteta

Naziv lokaliteta	Danska		Srbija		
	Laguna Amagerstrand	Stadsgaven, Kristijanija	Dunavac, Opovo	Baranda	Carska bara
Opšti tip vode	laguna	kanal	reka	močvara	močvara
Tip prema salinitetu	marinski	marinski	slatkovodni	slatkovodni	slatkovodni
Prosečne temperature vode u julu	17.6°C	17.6°C	20.5°C	20.5°C	20.5°C
Nadmorska visina	0.6 m	0.9 m	68 m	72 m	72 m



Slika 2. Prikaz aparature za MTB-zamke, odnosno sekundarno obogaćivanje uzoraka

Figure 2. MTB-trap apparatus, that is secondary enrichment of samples

Sekundarno obogaćivanje u trajanju od 24 h, vršeno je na sobnoj temperaturi metodom MTB-zamke, opisane od strane Jogler i sar. (2009) (slika 2). Kao rezervoar za primarno obogaćen uzorak korišćeni su normalni sudovi od 10 mL, sa probušenim rupama na naspramnim stranama suda, u koje su postavljeni nastavci za automatsku pipetu od 1 mL. Na sterilisanu aparaturu su dodate tube za prikupljanje ispod kojih su postavljeni magneti. Tako razdvojeni obogaćeni uzorci su zasejani na hranljive podloge čije recepture su date u prilogu. U hranljive podloge u koje su inokulisani uzorci sa marinskih lokaliteta dodata je i odgovarajuća količina NaCl kako bi se postigao optimalni salinitet

Svaki uzorak je zasejan u triplikatu. Svi medijumi su pravljeni kao polučvrsti. U MSGM i Blejkmor podlogama je umesto uobičajenog gvožđe-hinata korišćen gvožđe-galat kao izvor

jona gvožđa. Medijum se sastoji iz dve faze, sulfidnog dela i hranljivog dela podloge.

Vizuelizacija MTB. Nakon što je uočen rast bakterija u hranljivom medijumu u koji su inokulisani uzorci, pravljeni su mikroskopski preparati metodom viseće kapi. Preparati su posmatrani pod svetlosnim mikroskopom, korišćenjem objektiva 100×, uz prinošenje magneta u blizinu pločice.

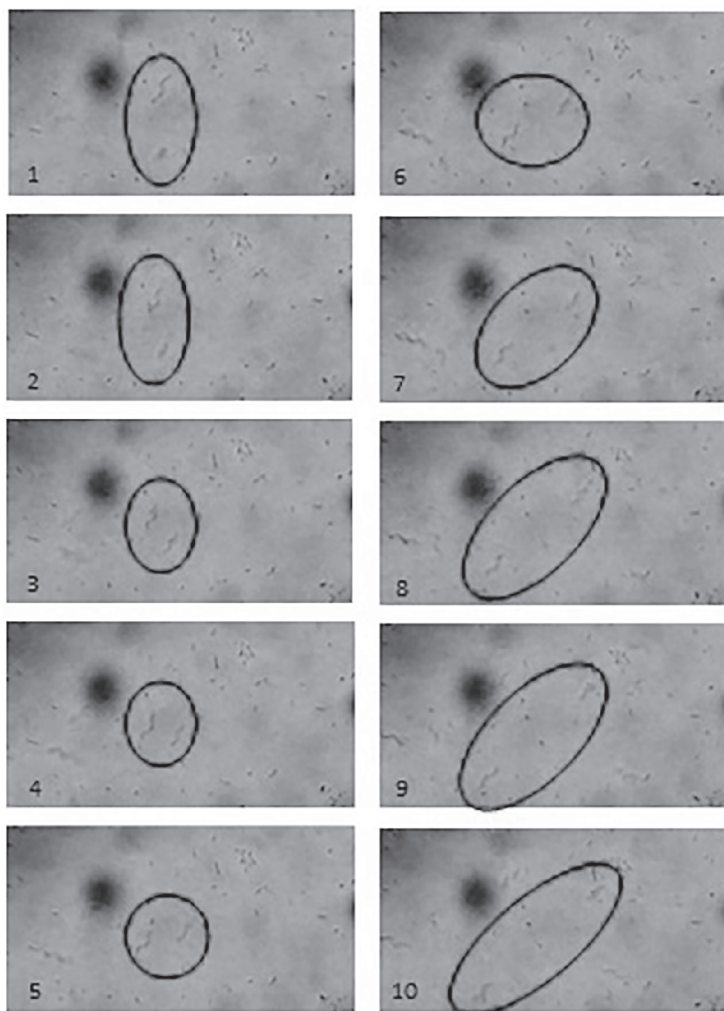
Izolacija DNK. Iz uzoraka kod kojih je konstatovano usmereno kretanje bakterija izolovana je DNK radi identifikacije. Izolacija je izvršena pomoću peqGOLDkita za izolaciju bakterijske DNK (Peqlab, VWR company, Danska), prema protokolu koji preporučuje proizvođač. Uzorci DNK su poslani na analizu sekvence gena za 16S rRNK, radi identifikacije bakterija koje su pokazale magnetotaksiju.

Rezultati i diskusija

Hranljive podloge koje su korišćene su različite, ali je intenzivan rast bakterijskih kolonija na svakoj bio primećen već nakon 24 h od inokulacije sekundarno obogaćenih uzoraka. U epruvetama sa M2 medijumom bile su karakteristične bele kolonije vlaknastog oblika, dok su u druga dva medijuma bile vidljive kolonije koje su formirale mrežastu strukturu. U svim kulturama je pri mikroskopiranju primećen veliki broj različitih bakterija za koje je potvrđeno da se ne kreću ka magnetnim polovima što se može objasniti neselektivnošću korišćenih podloga ili nedovoljnim obogaćivanjem uzoraka.

Blejkmor podloga je u sterilnom obliku imala ružičastu boju, a sa rastom bakterija na toj podlozi, ta boja se postepeno menjala u beličastu i postale su uočljive bakterijske kolonije. S obzirom na sastav podloge koji omogućava da se napravi gradijent kiseonika u epruvetama i time simuliraju uslovi oksidno-anoksične prelazne zone, najviše bakterija koje su pokazale usmereno kretanje ka polovima magneta izraslo je na ovoj podlozi (tabela 2).

M2 medijum ne sadrži vitaminski rastvor i pun spektar minerala, pa se moglo pretpostaviti da će rast bakterija na ovom medijumu biti ograničen. Broj kolonija u tom medijumu je bio manji u odnosu na druge medijume za isti vremenski period, ali su MTB primećene u uzorcima sa svih



Slika 3. Prikaz kretanja potencijalnih MTB, svetlosna mikroskopija 1000× povećanje

Figure 3. Movement of potential MTB, light microscopy with a 1000× enlargement

lokaliteta (tabela 3) što se može pripisati tome što je ova podloga redukovana tioglikolatnim jedi-
njenjem.

Tabela 2. Prisustvo potencijalnih MTB u uzorcima koji su rasli na Blejkmor medijumu po lokalitetima

Lokalitet	Primećeno usmereno kretanje prema:	
	severnom polu	južnom polu
Carska bara	+	+
Dunavac kod Opova	+	+
Močvare u Barandi	+	
Laguna Amagerstrand	+	
Kanal Stadsgaven		+

Tabela 3. Prisustvo potencijalnih MTB u uzorcima koji su rasli na M2 medijumu po lokalitetima

Lokalitet	Primećeno usmereno kretanje prema:	
	severnom polu	južnom polu
Carska bara	+	+
Dunavac kod Opova	+	+
Močvare u Barandi	+	
Laguna Amagerstrand	+	
Kanal Stadsgaven	+	

MSGM je podloga koja je najmanje redukovana i u u kojoj se ne uspostavlja gradijent kiseonika, ali sadrži širok spektar vitamina i minerala, što umanjuje njenu selektivnost. Na ovoj podlozi je rast bio najintenzivniji i pri mikroskopiranju je bilo teško primetiti usmereno kretanje ka magnetu, s obzirom na veliki broj bakterija prisutnih u svakom vidnom polju. Ipak, u uzorcima sa većine lokaliteta (svi osim Barande i Opova) je primećeno usmereno kretanje ka magnetnim polovima (tabela 4).

Tabela 4. Prisustvo potencijalnih MTB u uzorcima koji su rasli na MSGM po lokalitetima

Lokalitet	Primećeno usmereno kretanje prema:	
	severnom polu	južnom polu
Carska bara	+	+
Dunavac kod Opova		
Močvare u Barandi		
Laguna Amagerstrand	+	
Kanal Stadsgaven	+	

Uzorci sa lokaliteta Carska bara pokazali su prisustvo bakterija sa usmerenim kretanjem ka magnetnim polovima u svim podlogama. Pri mikroskopiranju, zabeleženo je prisustvo većeg broja potencijalnih MTB spiralnog morfotipa i u uzorcima koji su pri obogaćivanju privlačeni severnim polom i u uzorcima koji su bili okrenuti ka južnom polu. Karakteristično kretanje ovih bakterija je aksijalna magneto-aerotaksija. Ovaj rezultat je u skladu sa literaturnim podacima, koji taj model kretanja opisuju kod slatkovodnih vrsta MTB.

Sa lokaliteta Baranda takođe je izolovan mali broj potencijalno magnetotaksičnih bakterija, a mogući razlog su nepovoljni uslovi staništa u trenutku uzorkovanja.

U uzorcima sa marinskih lokaliteta primećen je veliki broj potencijalnih MTB koje su severno-plivajuće, što je očekivano za MTB na severnoj Zemljinoj hemisferi. Dominantne bakterije u ispitivanim uzorcima bile su spiralnog oblika, sa kretanjem nalik na aksijalnu magneto-aerotaksiju, iako je za marinske vrste očekivano da se kreću polarno.

Primećene MTB u uzorcima su bile dominantno severno-plivajuće, mada su se u uzorcima sa lokaliteta u Srbiji nalazile i južno-plivajuće bakterije, što je u skladu sa očekivanim. Za MTB je svojstveno da se u ekvatorijalnim područjima kreću i ka severnom i ka južnom magnetnom polu, kao i da se broj južno-plivajućih smanjuje idući ka severu i obrnuto. Jačina magnetnog polja na istraživanim lokalitetima iznosi 50252 nT u Kopenhagenu, odnosno 47866 nT na lokalitetima u Srbiji (preuzeto sa stranice za kalku-

Tabela 5. Rezultati analize gena za 16S rRNK

Lokalitet	Smer kretanja u magnetnom polju	Identifikovana vrsta
Carska bara	severno-plivajuće	<i>Aeromonas hydrophila</i> ili <i>Aeromonas sobria</i>
Carska bara	južno-plivajuće	<i>Pseudomonas putida</i> ili <i>Pseudomonas monteilli</i> (malo verovatno)
Carska bara	severno-plivajuće	<i>Pseudomonas monteilli</i> ili <i>Pseudomonas putida</i>
Carska bara	južno-plivajuće	<i>Aeromonas</i> sp. ili <i>Xantomonas</i> sp. (13% preklapanje)
Laguna Amagerstrand	severno-plivajuće	<i>Serratia</i> sp. ili <i>Serratia grimesii</i> ili <i>Serratia liquefaciens</i> ili <i>S. proteamaculans</i>
Kanal Stadsgaven	severno-plivajuće	<i>Sphingomonas</i> sp. ili <i>Alpha proteobacterium</i>

laciju geomagnetog polja organizacije National Centers for Environmental Information).

Analizom sekvence gena za 16S rRNK iz odabranih uzoraka u kojima je primećeno magnetom usmereno kretanje identifikovane su bakterije (tabela 5). Međutim, za identifikovane vrste je poznato da nisu magnetotoksične, a sa druge strane su dominantne vrste u vodenim staništima. Kulture iz kojih je izolovana DNK za analizu nisu bile čiste kulture, pa možemo pretpostaviti da je prisustvo magnetotoksičnih bakterija bilo maskirano dominantnijim vrstama.

Zaključak

Pošto je vizuelno utvrđeno magnetom usmereno kretanje u ispitivanim uzorcima, a za identifikovane vrste je poznato da nisu magnetotoksične, istraživanje je potrebno ponoviti, uz modifikacije. Potrebno je produžiti vreme, ili povećati broj magnetnih obogaćivanja, kao i izolovati čiste kulture pre identifikacije.

Literatura

Arakaki A., Shibusawa M., Hosokawa M., Matsunaga T. 2010. Preparation of genomic DNA from a single species of uncultured magnetotactic bacterium by multiple-displacement amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, **76**: 1480.

Atlas R. M. 2009. *Handbook of Microbiological Media*. CRC Press

Blakemore R. P., Maratea D., Wolfe R. S. 1979. Isolation and pure culture of a freshwater magnetic spirillum in chemically defined medium. *Journal of Bacteriology*, **140**: 720.

Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E (ur). 2006. *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria*. Springer, Vol. 2, str. 842-862.

Jogler C., Lin W., Meyerdieks A., Kube M., Katzmann E., Flies C., Pan Y., Amann R., Reinhardt R., Schuler D. 2009. Toward cloning of the magnetotactic metagenome; Identification of magnetosome island gene clusters in uncultivated magnetotactic bacteria from different aquatic sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**: 3972.

Lefevre C., Bazylynski D. 2013. Ecology, diversity, and evolution of magnetotactic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Review*, **77** (3): 497.

Ruan J., Kato T., Santini C., Miyata T., Kawamoto A., Zhang W., Bernadac A., Wu L., Namba K. 2012. Architecture of a flagellar apparatus in the fast-swimming magnetotactic bacterium MO-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109** (50): 20643.

Schüler D., Spring S., Bazylnski D. A. 1999. Improved technique for the isolation of magnetotactic spirilla from a freshwater sediment and their phylogenetic characterization. *Systematic and Applied Microbiology*, **22** (3): 466.

Spring S., Amann R., Ludwig W., Schleifer K.-H., Van Gernerden H., Petersen N. 1993. Dominating role of an unusual magnetotactic bacterium in the microaerobic zone of a freshwater sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**: 2397.

Stolz J. F. 1993. Magnetosomes. *Microbiology*, **139** (8): 1663.

Wolfe R. S., Thauer R. K., Pfennig N. 1987. A 'capillary racetrack' method for isolation of magnetotactic bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, **45** (1): 31.

Yan L., Zhang S., Chen P., Liu H., Yin H., Li H. 2012. Magnetotactic bacteria, magnetosomes and their application. *Microbiological Research*, **167** (9): 507.

and Stadsgaven channel (Copenhagen, Denmark) and freshwater sites: Dunavac in Opovo, bogs in Baranda and Carska bara (Serbia). Enriched samples were inoculated on growth media and media with observable bacterial growth were checked for directed movement of bacteria towards magnetic poles with the hanging drop method. Presence of bacteria moving in one direction within the magnetic field was observed in the samples from Carska bara (North and South-seeking), Amagerstrand lagoon and Stadsgaven channel in Copenhagen (North-seeking). DNA was isolated from samples in which the bacteria was directly moving in the presence of the magnet and it was sent for 16S rRNA sequence analysis (MacroGen Inc. The Netherlands) for identification. The found species are not magnetotactic, but they are commonly found in aquatic ecosystems, leading to the conclusion that those bacteria could have masked and hid the presence of MTB.

Silvija Milosavljević

Isolation and Identification of Magnetotactic Bacteria from Aquatic Ecosystem Sediment

Magnetotactic bacteria (MTB) are Gram negative, motile bacteria ubiquitous in aquatic ecosystems. They inhabit the oxic-anoxic transition zone and the anoxic regions. MTB synthesize intracellular crystals of ferric oxide and/or ferric sulphide which form magnetosomes, structures used for orienting in the Earth's geomagnetic field. MTB can be isolated from their habitat but their growth in culture is difficult due to their microaerophilic/anaerobic way of life and therefore these bacteria are not sufficiently explored. They have great potential for application in biotechnology and other applied science. The objective of this research is the isolation and identification of MTB from marine and freshwater ecosystems. Sampling was conducted from the following marine sites: Amagerstrand lagoon

Prilog

Recepture za korišćene hranljive podloge za magnetotoksične bakterije

Magnetospirillum 2 medijum (Atlas 2009):

Natrijum-acetat	1 g
Dikalijum-hidrogenfosfat	0.5 g
Natrijum-tioglikolat	0.5 g
Amonijum-hlorid	0.1 g
Ekstrakt kvasca	0.1 g
Amonijum-gvožđe(III)-citrat	0.2 mg
Agar	1.3 g
Destilovana voda	1 L

2. Medijum po Blejkmoru
(Dworkin *et al.* 2006):

Sulfidni agar	
Destilovana voda	100 mL
Na ₂ S	0.03g
Agar	1.5g

Slush agar:	
Voda	1 L
Vitaminski rastvor	1 mL
Mineralni rastvor	2 mL
Natrijum-sukcinat	0.05 g
Ekstrakt kvasca	0.05 g
NH ₄ Cl	0.05 g
MgSO ₄	0.05 g
0.5 mM kalijum fosfatni pufer	pH 7.0
Resazurin	2 mg
Agar	2 mg
Gvožđe(III)-galat	2 mL

3. Modifikovani MSGM medijum (pH 6.75)
(Atlas 2009):

Destilovana voda	1 L
Wolfe-ov vitaminski rastvor	10 mL
Wolfe-ov mineralni rastvor	5 mL
0.01 M Gvožđe-galat	2 mL
0.1% Resazurin	0.45 mL
KH ₂ PO ₄	0.68 g
KNO ₃	0.14 g
Askorbinska kiselina	0.035 g
Vinska kiselina	0.37 g
Ćilibarna kiselina	0.37 g
Natrijum-acetat	0.05 g
Agar	1.3 g

*Wolfe-ov vitaminski rastvor:

Biotin	2 mg
Folna kiselina	2 mg
Piridoksin-hidrohlrorid	10 mg
Tiamin-hidrohlrorid	5 mg
Riboflavin	5 mg
Nikotinska kiselina	5 mg
Vitamin B12	0.1 mg
p-Aminobenzoeva kiselina	5 mg
Lipoiniska kiselina	5 mg
Destilovana voda	1 L

*Wolfe-ov mineralni rastvor:

Nitritotrisirćetna kiselina	1.5 g
MgSO ₄ × 7H ₂ O	3 g
MnSO ₄ × H ₂ O	0.5 g
NaCl	1 g
FeSO ₄ × 7H ₂ O	0.1 g
CoCl ₂ × 6H ₂ O	0.1 g
CaCl ₂	0.1 g
ZnSO ₄ × 7H ₂ O	0.1 g
CuSO ₄ × 5H ₂ O	0.01 g
AlK(SO ₄) ₂ × 12H ₂ O	0.01 g
H ₃ BO ₃	0.01 g
Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O	0.01 g
Destilovana voda	1 L

*Rastvor gvožđe(III)-galata:

FeCl ₃ × 6H ₂ O	0.27 g
Galna kiselina	0.168 g
Destilovana voda	100 mL

