

Abschlussbericht:

Zuwendungsempfänger: Prof. Dr. Ch. Wilhelm, Universität Leipzig, Institut für Biologie I - Abteilung Pflanzenphysiologie Johannisallee 21-23 D-04103 Leipzig Tel.: 0341-9736874 / 70, Fax: 0341-9736899	Förderkennzeichen: 0339876
Vorhabenbezeichnung: „Bestimmung von C:N, C:P, C:Si Verhältnissen in Phytoplanktonzellen sowie dem absoluten Kohlenstoffgehalt mit Hilfe der FT-IR Spektroskopie“	
Laufzeit des Vorhabens: 01.07.2006-31.12.2009	

Abkürzungsverzeichnis: FTIR Spektroskopie, Fourier transformierte Infrarotspektroskopie; FACS, fluorescence assisted cell sorting; PAM Fluoreszenz, Puls-Amplituden modulierte Fluoreszenz; PCA principle component analysis; PLS-Analyse, partial least square Analyse;

Der Bericht stellt neben den wissenschaftlich-technischen Ergebnissen, die vom Zuwendungsempfänger erzielt wurden, auch die Daten der Unterauftragnehmer zusammen. Die beteiligten Kooperationspartner sind:

- Für die Bundesanstalt für Gewässerforschung:
Dr. Anette Becker und Volker Kirchesch
- Für das Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik (IGB):
Dr. Michaela Müller

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	2
I. Kurze Darstellung des Projektes	4
I.1. Aufgabenstellung	4
I.2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde.....	4
I.3. Planung und Ablauf des Vorhabens.....	5
I.4. Wissenschaftlich und technischer Stand, an dem angeknüpft wurde.....	6
I.5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen.....	7
II. Eingehende Darstellung.....	8
II.1. Erzielte Ergebnisse im Einzelnen	8
II.1.1 Entwicklung eines Probenaufbereitungsverfahrens für die FTIR Spektroskopie	8
II.1.2 Entwicklung von Auswertelgorithmen zur Bestimmung zellinterner Nährstoffverhältnisse ..	9
II.1.2.1. Bestimmung des C:N-Verhältnisses	11
II.1.2.2. Bestimmung des C:P-Verhältnisses.....	14
II.1.2.3. Bestimmung des C:Si-Verhältnisses.....	16
II.1.2.4. Alternative Möglichkeit die Wachstumsraten zu bestimmen.	18
II.1.3 Einzelzelltechnik und Mikroskop-gekoppelte FTIR Spektroskopie.....	19
II.1.3.1. Probenaufbereitung.....	19
II.1.3.2. Entwicklung und Testung der Hardware der Einzelzellspektroskopie	19
II.1.3.3. Mikroskopspektren im Vergleich zu Mikrotiterplattenspektren.....	23
II.1.3.4. Vergleichende Messungen mittels energiedispersiver Röntgenmikroanalyse (EDX)	25
II.1.4. Anwendung der FTIR Spektroskopie an Freilandphytoplankton	25
II.1.4.1 FTIR-Spektroskopie von Freilandproben auf Mikrotiterplatten.....	26
II.1.4.2 Direkte Mikroskop-gekoppelte FTIR-Spektroskopie an Freilandproben	27
II.1.4.3 Fluoreszenz gekoppelte Zellsortierung (FACS) als Methode für die Probenvorbereitung.....	28
II.1.5. Verbesserung von Gewässergütemodellen	32
II.1.6. Perspektive: FTIR Spektrum als potentielle Wachstumsprädiktoren	33
II.2. Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises.....	34
II.3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit.....	35
II.4. Voraussichtlicher Nutzen.....	36
II. 4.1. Anwendungen in der Biotechnologie	36
II.4.2 Gewässermonitoring	36
II.5. Während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordene Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens.....	37
II.6. Die erfolgten und geplanten Veröffentlichungen der Ergebnisse.....	38
II.6.1 Vorträge auf nationalen und internationalen Tagungen.....	38

II.6.2 Veröffentlichte Poster	38
II.6.3 Veröffentlichte und in Vorbereitung befindliche Publikationen.....	39
II.7. Literatur	40
III. Erfolgskontrollbericht	42
1. Beitrag der Ergebnisse zu den förderpolitischen Zielen.....	42
2. Wissenschaftliche Ergebnisse des Vorhabens, die erreichten Nebenergebnisse und die gesammelten wesentlichen Erfahrungen	42
3. Fortschreibung des Verwertungsplans	43
4. Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben	43
5. Präsentationsmöglichkeiten.....	43
6. Einhaltung der Ausgaben und Zeitplanung	43
IV. Berichtsblatt	

I. Kurze Darstellung des Projektes

I.1. Aufgabenstellung

Algenbiotechnologie und Gewässermonitoring erfordern einfache und effiziente Methoden zur Bestimmung biologischer Parameter, die den Wachstums- und Ernährungszustand photoautotropher Zellen charakterisieren. Im Rahmen dieses BMBF Projektes sollte geprüft werden, ob die Fourier transformierte Infrarot (FTIR) Spektroskopie genutzt werden kann, die zellinternen Nährstoffe zu bestimmen, daraus das Wachstumspotential der Phytoplanktonalgen zu ermitteln und somit die Robustheit von Wassergütemodellen zu verbessern. Während die gelösten Nährstoffe im freien Wasser leicht bestimmt werden können, sind die in Phytoplanktonzellen gespeicherten Nährstoffe analytisch kaum zugänglich. Das Wachstumspotential von Mikroalgen wird jedoch stark von den zellinternen Nährstoffkonzentrationen bestimmt. Diese werden üblicherweise durch die C:N, C:P und C:Si Verhältnisse in der Biomasse bestimmt. Zellinterne Nährstoffe sind bisher mit chemischen Analysen nur mit einem hohen Aufwand möglich und verlangen zudem Probenmengen, die bei Freilandproben in der Routine nicht gewonnen werden können. Vor allem ist es mit chemischen Methoden nicht möglich, die internen Nährstoffe in einer Phytoplanktongemeinschaft in den verschiedenen Phytoplanktongruppen zu bestimmen. Will man das Wachstumspotential einzelner taxonomischer Gruppen bestimmen, die für die Gewässergüte von besonderer Bedeutung sind, wie z.B. die Cyanobakterien, ist dies mit den vorhandenen Methoden nicht möglich. Es sollte untersucht werden, ob die FTIR Spektroskopie das Potential hat, mit mikroskopischen Mengen, die mit den Standardmethoden der Probennahme der Gewässertechnologie bereit gestellt werden können, die zellinternen Nährstoffe einzelner Phytoplanktontaxa quantitativ zu bestimmen. Desweiteren sollte dann untersucht werden, ob die taxon-spezifische Bestimmung von C:N oder C:P Verhältnissen die Gewässergütemodelle in der Anwendung robuster macht.

I.2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Eine Reihe von Methoden zur Bestimmung der physiologischen Zustände unter verschiedenen Anzuchtbedingungen ist eine der Hauptvoraussetzungen für die Durchführung des Vorhabens. So standen Verfahren zur Verfügung, mit denen eine kontrollierte Algenanzucht möglich ist. Diese Anzucht wurde anhand von Chemostatkulturen durchgeführt, da nur diese die Durchführung definierter Nährstofflimitierungsexperimente erlauben. Die vorhandenen physiologischen Methoden umfassen die Messung biooptischer Zelleigenschaften wie Lichtabsorption, die Bestimmung von Pigmentverhältnissen durch HPLC, sowie die Bestimmung der Primärproduktion anhand von Fluoreszenz- und Sauerstoffmessmethoden.

Die Messung der FTIR-Spektren erfolgt auf Mikrotiterplatten anhand eines FTIR-Spektrometers der Firma Bruker (Ettlingen, Deutschland). Mit diesem Gerät wurden bereits methodische Fortschritte zur Bestimmung von Einzelkomponenten (Stehfest et al. 2004) und der makromolekularen

Zusammensetzung von Phytoplanktonzellen etabliert (Stehfest et al. 2005). Zur Bestimmung der FTIR-Spektren an Freilandkulturen bedarf es I. einer Methode zur Separierung der Phytoplankton-großgruppen und II. der Möglichkeit der Einzelzellanalytik zur Vermessung von Zellen anhand eines Mikroskop-gekoppelten FTIR-Spektrometers. Für die Separierung der einzelnen Großgruppen wurden bereits Versuche mit einem Flowzytometer durchgeführt. Für das Projekt konnte ein Flowzytometer verwendet werden, was die Sortierung der einzelnen Gruppen ermöglichen sollte. Für die Durchführung der Einzelzellanalytik wurde im Rahmen des Projektes ein Mikroskop-gekoppeltes FTIR-Spektrometer angeschafft und die spektroskopischen Methoden erarbeitet und evaluiert.

I.3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Für die Bestimmung der zellinternen Nährstoffverhältnisse mussten zuerst verschiedene Probenaufbereitungsverfahren evaluiert werden und dann ein optimales Verfahren getestet werden, welches für die Durchführung der FTIR-Spektroskopie am geeignetsten ist. Anschließend werden anhand von Laborkulturen verschiedene Nährstoffzustände induziert. Dazu bedarf es Nährstoffmangelkulturen von verschiedenen Vertretern einzelner Algengroßgruppen. Hierzu wurden sehr zeit- und arbeitsintensive semikontinuierliche Chemostatkulturen verwendet, welche über einen längeren Zeitraum einen konstanten zellulären Nährstoffstatus ermöglichen. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mit FTIR-spektroskopischen Methoden vermessen. Die zellinternen Nährstoffe wurden mit herkömmlichen chemischen Analysen bestimmt.

Einer der Schwerpunkte des Vorhabens war die Kalibration der FTIR-Spektroskopie anhand der gewonnen chemischen Analysen. Hierzu wurden verschiedene PLS-Regressionsmodelle entwickelt. Die zellinternen Nährstoffverhältnisse spiegeln sich direkt in der makromolekularen Zellzusammensetzung des Phytoplanktons wider. Infolge dessen wurde erwartet, dass sich Unterschiede in den FTIR-Spektren mit chemisch bestimmten Nährstoffverhältnissen korrelieren lassen. Diese Kalibration sollte anschließend mit unbekanntem Zellen validiert werden, indem die Modellvorhersagen wiederum mit chemischen Analysen überprüft wurde. Nach der erfolgreichen Erstellung der PLS-Regressionsmodelle, sollte geprüft werden ob diese Methode im Freiland angewendet werden kann. Für eine Anwendung im Freiland bedurfte es zusätzlicher Probenvorbereitung um die einzelnen Großgruppen voneinander zu separieren. Hierfür wurde eine Zellsortierung mittels Flowzytometer verwendet. Außerdem wurde die Auswirkung der Zellfixierung mittels Lugolscher-Lösung, wie sie für Freilandproben notwendig ist, evaluiert.

Vergleichende Messungen anhand von mikrotiterplattengekoppelter FTIR Spektroskopie und Mikroskop-gekoppelter FTIR Spektroskopie der sortierten Freilandproben folgten. Auf diese Weise sollte gezeigt werden, dass die Methode auch für Einzelzellanalytik einsetzbar ist. Mit Unterstützung und Beratung des Fraunhofer Instituts in Stuttgart konnte ein Mikroskop-gekoppeltes FTIR-Spektrometer aufgebaut und das Setup getestet werden.

Nach der Methodenentwicklung wurden die Modelle an Freilandproben getestet. Die Probennahme entlang ausgewählter Fließgewässer erfolgte durch das BfG. Die ermittelten Daten sollten zeigen, ob