

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 unbekannten 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

die Genauigkeit des Gewässergütemodells „QSim“ unter Berücksichtigung der internen Nährstoffkonzentrationen verbessert. Das Modell „QSim“ wurde dementsprechend durch den Kooperationspartner (BfG) angepasst.

I.4. Wissenschaftlich und technischer Stand, an dem angeknüpft wurde

Das Wachstum von Phytoplankton ist für die Gewässerüberwachung und biotechnologische Anwendungen in Bioreaktoren eine entscheidende Größe. Die Veränderung der Biomasse wird dabei entscheidend durch das Nährstoffangebot reguliert. Neben dem eingestrahnten Licht und der Lichtabsorption wird daher der Nährstoffstatus der Zellen in Wachstumsmodellen berücksichtigt. Dabei lassen sich zwischen zwei verschiedenen Ansätzen unterscheiden:

A: Monod (1942) beschrieb mittels mathematischer Funktionen, wie das Wachstum durch externe Nährstoffkonzentrationen eines limitierenden Nährstoffs bestimmt wird. Dieses Modell hat sich inzwischen als zu einfach erwiesen und wurde daher weitgehend durch eine Weiterentwicklung ersetzt.

B: Das Modell basierend auf den Arbeiten von Droop (1973) geht von einer variablen Menge an intern gespeicherten Nährstoffen aus, welche durch die zellulären C:P und C:N Verhältnisse (cell quota model) dargestellt werden können. Die Wachstumsvorhersagen werden dann nicht ausschließlich anhand der externen Nährstoffkonzentrationen modelliert. Stattdessen werden die intern gespeicherten Nährstoffe und die Aufnahmekinetiken bei der Wachstumsprognose berücksichtigt. Minimale und maximale C:Nährstoff-Verhältnisse müssen gesetzt werden und bilden neben der maximalen Aufnahmerate die Algengruppen-spezifische Parametrisierung des Modells.

Die Validierung des Droop-Modells in der Praxis erfordert jedoch die Lösung einiger praktischer Messprobleme. In Chemostatkulturen lassen sich die externen Nährstoffparameter gut überwachen; für die Messung der zellinternen Nährstoffkonzentrationen werden derzeit biochemische Methoden verwendet, welche einer Reihe von Einschränkungen unterliegen. So muss vor allem ausreichend Biomasse vorhanden sein, um mit Hilfe der chemischen Elementaranalyse C, N und P direkt zu bestimmen. In natürlichen Phytoplanktonproben ist die Biomassekonzentration im Vergleich zu Laborkulturen sehr niedrig. Die internen Nährstoffkonzentrationen sind daher noch nicht direkt routinemäßig messbar. Es wurden bisher verschiedene Ansätze getestet, um die Nährstoffparameter trotzdem zu messen. Dies reicht von der Konzentration der Proben durch Filtration, Messungen der Isotopen markierten C, N sowie P Aufnahmeraten in geschlossenen Gefäßen bis zu Bioassays (Dodds et al. 1993). Die Anreicherung durch Filtration wird durch Bakterien und Detritus so stark gestört, dass die zuverlässige Messung von zellinternen Nährstoffen nicht möglich ist. Es wurde weiterhin versucht, den Nährstoffgehalt anhand von Biovolumen zu korrelieren (Montagnes et al. 1994), oder mittels Röntgen-Fluoreszenz Mikroskopie die Elementarzusammensetzung zu bestimmen (Twining et al. 2003). Diese Methoden sind jedoch entweder extrem aufwendig oder können keine taxonomisch aufgelösten Daten liefern. Daher wurde bisher bei der Gütemodellierung das Droop-Modell nicht mit

gemessenen Daten, sondern mit Annahmen für die minimale und maximale Nährstoffkonzentrationen parametrisiert, was wiederum sehr kritisch zu betrachten ist (Falkowski 2000).

Spektroskopische Auswerteverfahren wie PCA (principle component analysis) und PLS-Regressionsanalysen basierend auf FTIR-Spektren lassen sich inzwischen auch in den Pflanzenwissenschaften wiederfinden (Sacksteder und Barry 2001). Diese Verfahren können zum Beispiel dazu genutzt werden, Inhaltsstoffanalysen in biologischen Materialien durchzuführen. So konnte gezeigt werden, dass FTIR-Spektren mit der makromolekularen Zusammensetzung von Zellen korrelieren (Giordano et al. 2001). Weiterhin wurde die FTIR-Spektroskopie für die Analyse verschiedener Inhaltsstoffe wie z.B. Rosmarinsäure verwendet (Stehfest et al. 2004) und für physiologische Messungen zur Untersuchung des photosynthetischen Elektronentransports eingesetzt (Groot et al. 2005). Eine quantitative Analyse der gesamten makromolekularen Zusammensetzung war vor Beginn des Projektes nicht möglich. Ebenso waren keine Arbeiten bekannt, bei denen anhand der FTIR-Spektren die elementare chemische Zusammensetzung von Zellen bestimmt werden konnte.

Um die FTIR-Spektroskopie für Phytoplankton in natürlichen Gewässern anzuwenden und den zellinternen Nährstoffgehalt anhand der Spektren zu bestimmen, waren demnach zwei Methoden zu entwickeln. Die erste bestimmt mittels FTIR-Spektroskopie generell die quantitative Nährstoffzusammensetzung in Phytoplanktonzellen anhand von PLS-Regressionsmodellen. Die zweite Methode ist notwendig, um in Freilandproben eine artspezifische Differenzierung durchführen zu können. Hierzu sollte die Mikroskop-gekoppelte FTIR-Spektroskopie für Phytoplankton weiterentwickelt werden.

I.5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Innerhalb des Projektes wurden zwei weitere Partner in die Arbeiten eingebunden. Gemeinsam mit dem Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik der Fraunhofer Gesellschaft in Stuttgart sollte eine technische Lösung für die Mikroskop-gekoppelte FTIR-Spektroskopie ausgearbeitet werden. Anschließend wurde die neu angeschaffte Technik am IGB Stuttgart aufgebaut und getestet. Weiterhin sollte am IGB das IR-Verfahren mittels Röntgenmikroanalyse auf seine Zuverlässigkeit untersucht werden. Dabei sollten vergleichende Messungen durchgeführt werden, um die anhand der FTIR-Spektren ermittelten internen Nährstoffkonzentrationen zu validieren.

Der zweite Kooperationspartner, die Bundesanstalt für Gewässerkunde (BfG) in Koblenz, modelliert die Gewässergüte mit Hilfe des Modells „QSim“. Der in diesem Modell enthaltene Phytoplanktonbaustein arbeitet bisher mit Literaturdaten für die minimalen und maximalen zellinternen Nährstoffgehalte und maximalen Aufnahmeraten der drei verschiedenen Algengruppen (Bacillariophyceen, Chlorophyceen, Cyanobakterien). Das Modell sollte zuerst mit Hilfe tatsächlich gemessener Werte (zellinterne C:P, C:N und C:Si Verhältnisse) weiterentwickelt und anschließend durch die Bestimmung der zellinternen Nährstoffkonzentrationen mittels FTIR-Spektroskopie validiert werden. Hierzu erfolgten Probennahmen an Freilandgewässern im Rahmen von BfG-Bereisungen.

II. Eingehende Darstellung

II.1. Erzielte Ergebnisse im Einzelnen

II.1.1 Entwicklung eines Probenaufbereitungsverfahrens für die FTIR-Spektroskopie

Im Rahmen des Projektes sollte ein einfach durchzuführendes Probenaufbereitungsverfahren für Phytoplankton entwickelt werden. Dieses Teilziel konnte vollständig erfüllt werden. Die Probenvorbereitung wurde dabei sowohl für den hohen Probendurchsatz mittels Mikrotiterplattenmodul, als auch für die Mikroskop-gekoppelte FTIR-Spektroskopie entwickelt und erfolgreich getestet. Verschiedene Faktoren fanden dabei Berücksichtigung um die Methode standardisiert für alle untersuchten Phytoplanktonarten anzuwenden.

Das Probenaufbereitungsverfahren sollte über einige grundlegende Eigenschaften verfügen. Es muss praktikabel und schnell durchführbar sein, da es für eine große Anzahl an Proben in einem engen Zeitraum angewendet werden soll. Zudem sollten die Zellen durch das Verfahren nicht geschädigt werden. Bisher wurden verschiedene Probenvorbereitungsverfahren für die FTIR-Spektroskopie an Algenzellen angewendet. Die Aufkonzentration der Algen erfolgte meist durch Zentrifugation (Sigee 2002, Domenighini et al. 2009, Patel 2009), oder im Falle von sehr empfindlichen Arten durch Filtration (Domenighini et al. 2009). Anschließend werden die Zellen entweder mit *aqua dest.* (Sigee 2002, Patel 2009) und alternativ dazu mit Ammoniumformiat (Domenighini et al. 2009) gewaschen. Zum Teil werden die Algen vor der Messung noch homogenisiert, was entweder durch Zerreiben von getrockneter Biomasse (Pistorius 2008), oder durch Gefrier/Tau-Zyklen in flüssigem Stickstoff geschieht (Sigee 2002, Patel 2009). Die anschließende Auftragung der Probe auf den Probenhalter erfolgt meistens in *aqua dest.* (Pistorius 2008), kann aber auch mit dem Iso-Osmotikum Ammoniumformiat durchgeführt werden (Domenighini et al. 2009).

Da im Rahmen des Vorhabens verschiedenste Algenzellen mit einem hohen Probendurchsatz verwendet wurden, ist die Probenvorbereitung so gewählt worden, dass ein möglichst schnelles Verfahren auch für empfindliche Algen entwickelt werden konnte. Da für Phytoplankton die Zentrifugation ungeeignet ist, da dabei empfindliche Zellen zerstört werden, wurde die Aufkonzentration der Zellen in einem ersten schonenden Schritt mittels Filtration durchgeführt. Die Waschschriffe erfolgten mit *aqua dest.* Die Auftragung der Proben erfolgte ebenfalls in *aqua dest.*, gefolgt von der Trocknung für 10 min bei 40° C. Die Trocknung hatte ein Aufplatzen der Zellen zur Folge, was eine homogene Schicht auf dem Probenhalter zur Folge hatte. Daher konnte auf eine Homogenisierung der Proben verzichtet werden. Das beschriebene Verfahren lieferte sehr gut reproduzierbare Ergebnisse und kann für Laboranwendungen, wie sie im Labor und in der Biotechnologie erforderlich sind, eingesetzt werden.

Im Gegensatz zu der Vermessung von Laborkulturen mit einem Mikrotiterplattenmodul, ist die Vermessung von Freilandproben aufwendiger. Durch die geringe Biomasse sind entweder Anreicherungsverfahren nötig, oder es muss auf Einzelzellanalytik zurückgegriffen werden. Bakterien und Detritus, welche im Gegensatz zu Laborkulturen einen großen Anteil der organischen Substanzen in Freilandproben umfassen, können durch die verwendeten Anreicherungsverfahren nicht von den Phytoplanktonzellen getrennt werden, wodurch die darauffolgenden Messungen stark gestört werden. Es wurde daher im Rahmen des Projektes die alternative Einzelzellanalytik ausgearbeitet und ein Probenaufbereitungsverfahren auf der Basis der auf Fluoreszenz basierten Durchflusszytometrie getestet (siehe II.1.4.3).

Weiterhin kommt erschwerend hinzu, dass Freilandproben nicht direkt am Ort der Probennahme vermessen werden können, und aufgrund der Entfernung der Probennahmestelle zum durchführenden Labor nur mit einem größeren zeitlichen Abstand untersucht werden können. Hierzu ist es notwendig, für diese Proben eine Vorgabe zur Fixierung der Probe zu erstellen. Wichtig ist hierbei, dass die Fixierung weder die Auftrennung der einzelnen Algengruppen noch das FTIR-Signal beeinträchtigt. Dabei hat sich die Verwendung von Lugolscher Lösung bewährt. Diese hat zunächst keinen Einfluss auf das IR-Spektrum, führt aber bei längerer Aufbewahrungsdauer dazu, dass Freilandproben nicht mehr sauber in ihre Großgruppen getrennt werden können. (II.1.4.3). Für die Gewässeranalyse wird daher empfohlen, Lugolsche Lösung mit einer Konzentration von 0.1% zur Fixierung der Proben zu verwenden. Solche Proben können vor der Messung bis zu 14 Tagen gelagert werden, um FTIR-spektroskopisch untersucht zu werden. Die Fixierung mit Lugolscher Lösung hat zudem den Vorteil, dass sowohl Probennahme als auch Fixierung für die FTIR Analyse und für die mikroskopische Phytoplanktonanalyse nach Utermöhl (1959) gleich sind. Damit kann die FTIR Spektroskopie je nach Bedarf ergänzend eingesetzt werden.

II.1.2 Entwicklung von Auswertalgorithmen zur Bestimmung zellinterner Nährstoffverhältnisse

Um aus IR-Spektren das Verhältnis von C:N, C:P und (bei Diatomeen) das C:Si anhand von FTIR-Spektren zu bestimmen, wurden in verschiedenen Phytoplanktonarten unterschiedliche Nährstoffkonzentrationen durch Variation des Nährstoffangebots erzeugt und die FTIR Spektroskopie durch klassische Elementaranalyse kalibriert. Auf diese Weise konnten für die 3 großen Algengruppen Grünalgen, Bacillariophyceen und Cyanobakterien Auswertalgorithmen für die Bestimmung von C:N und C:P erstellt werden. Für Bacillariophyceen wurde die Methode auch für die Bestimmung des C:Si Verhältnis etabliert. Für jede der drei Großgruppen wurde jeweils mindestens ein Süßwasser-Modellorganismus gewählt. So kamen für Grünalgen Zellen von *Chlamydomonas reinhardtii*, für die Cyanobakterien *Microcystis aeruginosa* und für die Bacillariophyceen *Cyclotella meneghiniana* und *Skeletonema costatum* (marin) zum Einsatz. In Vorversuchen wurde untersucht, ob die IR-Spektren von Süßwasserdiatomeen grundsätzliche Unterschiede zu Salzwasserarten aufweisen. Dabei wurde

festgestellt, dass die artspezifischen Unterschiede hauptsächlich im Bereich der Silikatabsorption zwischen 950 und 1100 Wellenzahlen auftreten und durch den unterschiedlichen Bau der Silikatschale bedingt sind. Daher wurde die Diatomeengattung *Cyclotella* ausgewählt, weil diese sowohl in Süß- als auch in Brack- und Meerwasser vorkommt und die sich in ihrem Silikatgehalt gut verändern lässt.

Der Hauptteil des Projektes bestand demnach darin, Auswertelgorithmen zu entwickeln, um aus IR-Spektren das Verhältnis von C:N, C:P und (bei Diatomeen) das C:Si zu bestimmen. Die Entwicklung von Algorithmen basierend auf FTIR-Spektren erfolgte ausschließlich mit Laborkulturen, da nur mit diesen die Elementaranalysen möglich sind. Die erzielten Auswertemodelle sind somit für Algenreinkulturen, wie z.B. in biotechnologischen Prozessen anwendbar. Inwieweit sie auch für Applikationen in der Gewässergütemodellierung herangezogen werden, wird in Kapitel II.1.5. erläutert. Für die Methodenentwicklung wurden in verschiedene Phytoplanktonarten, welche den verschiedenen Großgruppen zuzuordnen sind, (Übersicht Tabelle 1) unterschiedliche und genau definierte Wachstumsraten durch Nährstoffmangel induziert und von diesen physiologisch charakterisierten Zellen FTIR Spektren erstellt.

Tabelle 1: Verwendete Arten für die Erstellung und Validierung von FTIR-Spektroskopie basierten Modellen zur Bestimmung von Elementarverhältnissen unter verschiedenen Nährstoffmangelsituationen

	Art	Getestet für Nährstoffmangel:
Chlorophyceen	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> <i>Chlorella vulgaris</i>	Stickstoff (N), Phosphat (P)
Bacillariophyceen	<i>Cyclotella meneghiniana</i> <i>Phaeodactylum tricornutum</i> <i>Skeletonema costatum</i>	Stickstoff (N), Phosphat (P), Silikat (Si) Silikat (Si)
Cyanophyceen	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Stickstoff (N), Phosphat (P)
Eustigmatophyceae	<i>Monodus subterreanus</i>	
Dinophyceae	<i>Amphidinium spec.</i>	Stickstoff (N)
Cryptophyceen	<i>Cryptomonas ovata</i>	Stickstoff (N)
Chrysophyceae	<i>Chromulina spec.</i>	Stickstoff (N)

Hierzu wurden Chemostatkulturen verwendet, mit denen sich die Wachstumsrate sehr reproduzierbar über die Nährstoffversorgung regulieren lässt. In herkömmlichen Batchkulturen nimmt die externe Nährstoffkonzentration ständig ab. Dadurch kann die Wachstumsrate nicht direkt mit den verfügbaren Nährstoffen korreliert werden. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei den Chemostatkulturen um semikontinuierliche Anzuchtreaktoren, bei denen in regelmäßigen Abständen definierte Nährstoffmengen hinzugegeben werden. Gleichzeitig wird die Kultur so verdünnt, dass sich eine

stabile gleichbleibende Zelldichte einstellt. Diese Anzucht hat den Vorteil, dass über einen längeren Zeitraum von mehreren Wochen gleichbleibende Wachstumsraten bei gleicher Nährstoffverfügbarkeit erzielt werden können. Dies erfordert jedoch relativ niedrige Zelldichten, um die Lichtverfügbarkeit bei verschiedenen Nährstoffkonzentrationen gleich zu halten. Die geringen Zelldichten liefern nur wenig Zellmaterial bei niedrigen Wachstumsraten. Daher wurden die ursprünglich im Projekt geplanten Wachstumsstufen 100%, 50%, 20% und 10% des maximalen Wachstums bei Nährstoffsättigung, auf die Stufen 100%, 75%, 50% und 25% verändert. Der 100% Wert stellt die Wachstumsrate dar, die sich durch Nährstoffzugabe bei denen gegebenen Lichtverhältnissen nicht weiter steigern lässt. Kulturen mit einem Überangebot von Nährstoffen wurden nicht untersucht, weil in diesem Fall keine Korrelation mehr zwischen zellinternem Nährstoff und Wachstumsrate besteht. Chemostatexperimente mit konstanter niedriger Wachstumsrate sind leider sehr zeitaufwendig, liefern aber mit Abstand die beste Grundlage für die reproduzierbare Korrelation von Wachstumsraten mit den C:N bzw. C:P Verhältnissen und damit für die Kalibrierung der FT-IR Spektroskopie. Somit konnte eine solide Korrelation zwischen Wachstumsrate und C:N, C:P und C:Si Verhältnissen auf der Grundlage von Elementaranalysen hergestellt werden.

II.1.2.1. Bestimmung des C:N-Verhältnisses

Die Korrelation von Wachstumsrate und mittels chemischen Analysen gemessenen zellinternen Nährstoffen zeigt eine lineare Abhängigkeit unter den verschiedenen Nährstoffzugaben (Tabelle 2) für die einzelnen untersuchten Großgruppen (Abbildung 1). Die Daten zeigen weiterhin, dass diese Korrelation artspezifisch ist, ebenso wie die absolut gemessenen zellinternen Nährstoffverhältnisse.

Die Kalibration der FTIR Spektren mit den chemisch gemessenen C:N Verhältnissen erfolgte jeweils in folgenden Arbeitsschritten. Die Algen aus den unterschiedlichen Nährstoffzuständen wurden geerntet und deren FTIR-Spektren vermessen. Von den geernteten Zellen wurde mittels Elementaranalyse das C:N Verhältnis bestimmt. Diese Spektren wurden anschließend mit den Daten der Elementaranalyse korreliert. Hierfür wurde ein Regressions Algorithmus der kleinsten Fehlerquadrate (partial least square regression: PLS) verwendet.

Tabelle 2: N-Nährstoffversorgung der Kulturen pro Tag und die daraus resultierende Wachstumsrate.

Taxon	externe N-Konzentration [mg l ⁻¹]	Wachstumsrate [μ ⁻¹]
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	0,21 – 0,05	0,399 – 0,086
<i>Cyclotella meneghiniana</i>	0,146 -0,037	0,320 – 0,071
<i>Microcystis aeruginosa</i>	0,53 -0,13	0,299 – 0,066

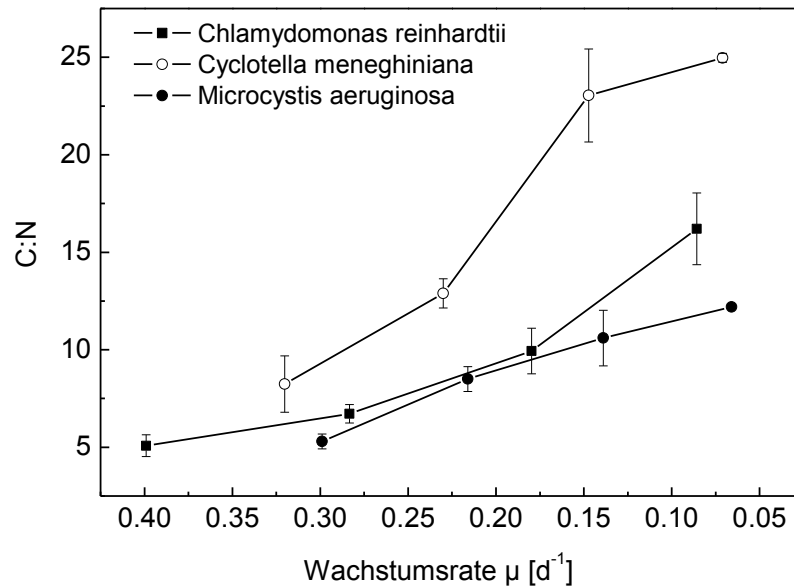


Abbildung 1: Zusammenhang von C:N Verhältnis und Wachstumsrate in drei verschiedenen Algenarten

Diese mathematische Methode ist in dem Auswertesoftwarepaket des Geräteherstellers (Bruker, Karlsruhe) enthalten und somit allgemein zugänglich. Die Kalibrationsfunktion beschreibt den Zusammenhang zwischen den Spektren und der gesuchten Größe, welche in diesem Falle das interne Nährstoffverhältnis darstellte. Dabei werden die Spektren auf wenige Faktoren reduziert und anhand mehrerer PLS Vektoren eine Korrelation zwischen der gesuchten Größe und der spektralen Intensität der Kalibrationsspektren hergestellt, bis der so genannte Regressionskoeffizient (ebenfalls ein Vektor) eine gleich bleibende Reproduzierbarkeit anzeigt. Vor der jeweiligen Validierung eines Modells, werden die Spektren mit einer Reihe von mathematischen Berechnungen bearbeitet. Zunächst wurde eine Basislinienkorrektur nach der „Gummibandmethode“ mit 64 Stützpunkten vorgenommen. Danach wurde empirisch aus einem Set von verschiedenen Normierungsroutinen, diejenige Normierung ermittelt, die die besten Vorhersagewerte, bzw. die kleinsten Fehler lieferte. In jedem Falle diente das Bestimmtheitsmaß (R^2) als Gütekriterium, ebenso wie der Root-mean-square error of cross-validation (RMSECV).

Nachdem die Kalibration mittels PLS-Regression für den jeweiligen Organismus durchgeführt wurde, konnte das Modell mit anderen Organismen und/oder dem gleichen Organismus validiert werden, wie es im Folgenden am Beispiel der Grünalgen dargelegt wird (Abbildung 2). Dazu wurden andere Phytoplanktonarten unter verschiedenen Bedingungen der Stickstoffversorgung kultiviert, die IR-Spektren gemessen und unter Anwendung des Modells ein C:N Wert vorhergesagt. Dieser Wert wurde zu dem C:N Wert, der aus einer unabhängigen Elementaranalyse des gleichen Probenmaterials gewonnen wurde, ins Verhältnis gesetzt. Hierbei wird deutlich, dass das Auswertemodell für die FTIR Spektren, das anhand eines Vertreters einer spezifischen Großgruppe (*Chlamydomonas*, Grünalge) erstellt wurde, nicht nur für andere Grünalgen gültig ist, sondern damit auch für Vertreter anderer

Algengruppen (*Chrysophyta*, *Cryptophyta* oder *Dinophyta*) das C:N Verhältnis bestimmt werden kann. Allerdings ist das Modell nicht für Diatomeen anwendbar, welche eine Silikatschale haben, die bis zu 30% der elementaren Zusammensetzung bestimmt.

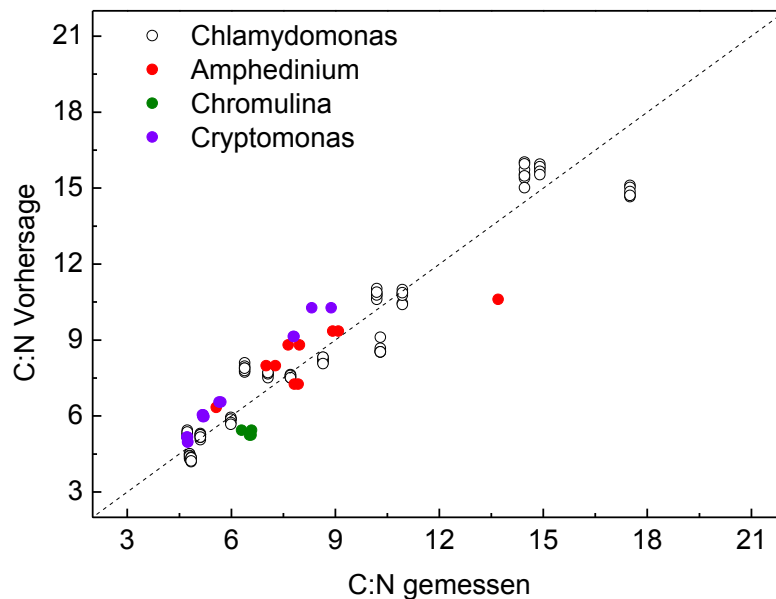


Abbildung 2: Validierung der PLS-Regression zur Bestimmung des C:N Verhältnis in Grünalgen. Die FTIR basierte Vorhersage des C:N Verhältnis wird dabei gegen die chemisch bestimmte Nährstoffzusammensetzung aufgetragen. Erstellt wurde das Modell mit der Grünalge *Chlamydomonas*. Zur unabhängigen Validierung wurden die Dinophyceen *Amphedinium* (rot), die Chrysophyceen *Chromulina* (grün) und die Cryptophyceen *Cryptomonas* (violett) verwendet.

Aufgrund dieser Einschränkung wurden drei verschiedene Modelle aufgestellt, jeweils eines für die Gruppen der Cyanobakterien, der silikathaltigen Bacillariophyceen und für die restlichen Algengruppen (Tabelle 3). Dieser Übersicht ist zu entnehmen, dass die Methode für alle der untersuchten Algengruppen in dem analysierten Kalibrationsbereich angewendet werden kann.

Tabelle 3: Übersicht der entwickelten PLS-Regressionsmodelle für die verschiedenen Phytoplanktongruppen. Der Kalibrationsbereich gibt an, bis zu welchen zellinternen C:N Verhältnissen die Modelle arbeiten können. Als Gütekriterium diente R^2 .

Algengruppe	Erstellte Modelle	Kalibrationsbereich	R^2	Für die Kalibration verwendeter Organismus
Chlorophyceen	C:N Modell	4.73 -17.5	96.5	<i>Chlamydomonas</i>
Bacillariophyceen*	C:N Modell	7.65-24.97	98.4	<i>Cyclotella</i>
Cyanophyceen	C:N Modell	4.65-12.09	98.8	<i>Microcystis</i>

*(ohne Silikatschale)

Die Gütekriterien R^2 zeigten dabei eine sehr gute Korrelation der FTIR-Spektren und der daraus ermittelten zellinternen C:N-Verhältnisse. Bei der Analyse von Phytoplankton muss jedoch eine

Einschränkung gemacht werden. Da es technisch nicht möglich war, den Kalibrationsbereich für den internen Nährstoffgehalt unendlich niedrig bzw. unendlich hoch (extreme hohe Nährstoffspeicher) auszuweiten, können lediglich Zellen analysiert werden, die über Nährstoffgehalte verfügen, welche von dem Kalibrationsbereich abgedeckt werden. Zellen die sich außerhalb dieses Bereiches befinden, werden von dem Modell als mathematische Ausreißer erkannt und gekennzeichnet.

II.1.2.2. Bestimmung des C:P-Verhältnisses

Analog zu der Bestimmung der C:N Verhältnisse wurde auch für das C:P Verhältnis die Korrelation von Nährstoffverfügbarkeit und der Wachstumsrate μ unter verschiedenen Nährstoffkonzentrationen erarbeitet (Tabelle 4). Auch hier zeigt sich eine Abhängigkeit der Wachstumsrate von dem verfügbaren P (Abbildung 3). Das Verhältnis erstreckte sich dabei für die Grünalgen und die Bacillariophyceen über einen sehr großen Bereich, während Cyanobakterien ihre internen P Verhältnisse relativ konstant hielten.

Tabelle 4: PO_4^{3-} -Nährstoffversorgung der Kulturen pro Tag und die daraus resultierende Wachstumsrate.

Taxon	externe PO_4^{3-} -Konzentration [mg l^{-1}]	Wachstumsrate [μ^{-1}]
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	0,21 – 0,05	0,399 – 0,086
<i>Cyclotella meneghiniana</i>	0,146 -0,037	0,320 – 0,071
<i>Microcystis aeruginosa</i>	0,53 -0,13	0,299 – 0,066

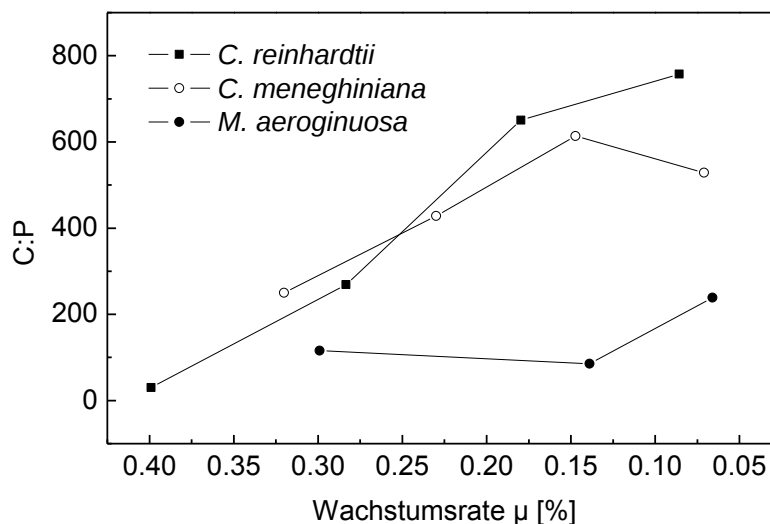


Abbildung 3: Zusammenhang von C:P Verhältnis und Wachstumsrate in drei verschiedenen Algenarten.

Die Erstellung der Modelle für die Bestimmung der zellinternen C:P Verhältnisse erfolgten analog zu den Berechnungen für die C:N-Modelle (siehe II.1.2.1). Die Validierung der Modelle zeigte wiederum eine sehr gute Vorhersagegenauigkeit der C:P Verhältnisse, wie am Beispiel der Grünalge *C.*

reinhardtii und der Bacillariophyceae *C. meneghiniana* dargestellt wird (Abbildung 4). Das Modell für die Cyanobakterien zeigten ähnlich gute Ergebnisse wobei die Vorhersagegenauigkeit aller Modelle $R^2 > 96.6$ betrug.

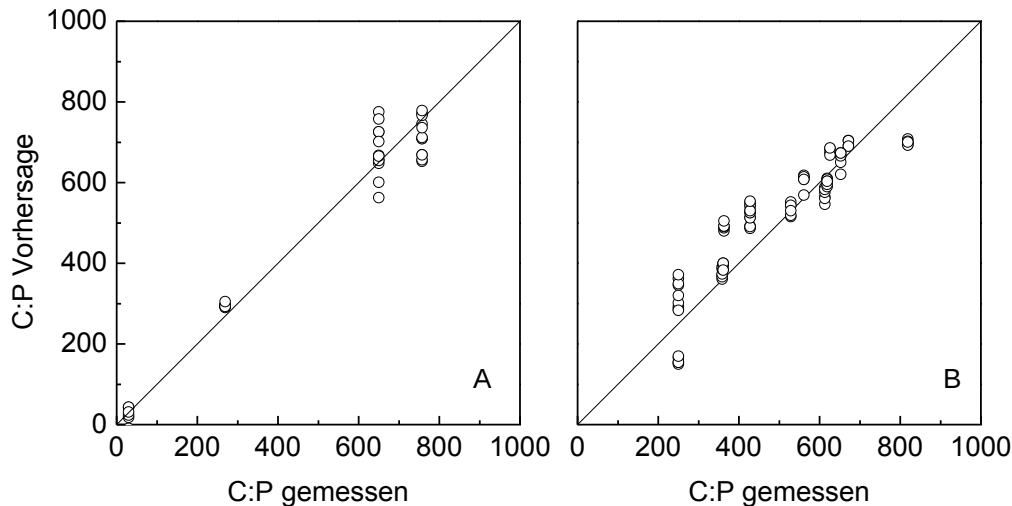


Abbildung 4: Validierung der PLS-Regression zur Bestimmung des C:P Verhältnisses in (A) Grünalgen und (B) Bacillariophyceen. Die FTIR-basierte Vorhersage des C:P Verhältnisses wird dabei gegen die chemisch bestimmte Nährstoffzusammensetzung aufgetragen.

Nach der Erstellung der PLS-Regressionsmodelle, sollte überprüft werden, ob sich diese anhand von Modellorganismen erarbeiteten Modelle als generelle Modelle für eine Vielzahl von Arten verwenden lässt. Diese Validierung mit zusätzlichen Arten, war im Gegensatz zur Bestimmung der C:N Verhältnisse weniger eindeutig. Während die FTIR-Spektren in allen Algengruppen richtige C:N Verhältnisse voraussagen konnten, war dies bei C:P nicht der Fall (

Tabelle 5). Dies ist auf mehrere Faktoren zurückzuführen. (1) Die Elementaranalyse für die C und N Analyse liefert zuverlässige Daten. (2) Die FTIR-Spektren sind dominiert von den drei makromolekularen Gruppen Protein, Kohlenhydrat und Lipid. Änderungen im C:N Verhältnis, bzw. in der N-Verfügbarkeit haben direkte Auswirkungen auf den Proteinstoffwechsel, so dass eine Abnahme der Proteinbande im Verhältnis zu Kohlenhydratbande direkt mit dem C:N Verhältnis korreliert ist.

Die Ursachen können auf folgende Sachverhalte zurückgeführt werden: (1) Die Referenzanalyse zur Bestimmung des elementaren P-Gehaltes wurde nach DIN-Norm von einem unabhängigen Dienstleister durchgeführt. In Parallelproben, die durch Aliquotierung hergestellt wurden, waren die Fehlerschwankungen sehr hoch. Infolge dessen wurden die Probenmengen erhöht, wodurch für die P-Bestimmung deutlich weniger Datenpunkte gemessen werden konnten, was sich negativ auf die Modelle auswirkt. (2) Die FTIR-Spektren verfügen nicht über einen konkreten P-Marker. Hier müssen zwei Faktoren beachtet werden. Die Verfügbarkeit von P verändert die makromolekulare Zusammensetzung, d.h. das Protein:KH:Lipid Verhältnis ändert sich. Der verwendete PLS-

Regressionsalgorithmus berechnet demnach nur indirekt die Auswirkungen des P-Mangels. Eine direkte Korrelation wie das Protein:KH Verhältnis mit dem C:N Verhältnis existiert nicht.

Tabelle 5: Zelluläre Elementarverhältnisse verschiedener Algen, ermittelt durch PLS Regressionsmodelle für FTIR-Spektren. Validierung der berechneten Modelle der Modellorganismen (Abbildung 2 und Abbildung 4) durch andere Phytoplanktonarten.

Art	Ernährungszustand	C:N	C:P
<i>Amphidinium spec.</i>	Vollmedium	6.3	*
<i>Cryptomonas ovata</i>	Vollmedium	5.7	*
<i>Chromulina spec.</i>	Vollmedium	7.2	*

* entspricht einer zu hohen mathematischen Differenz des Spektrums zu den im Modell verwendeten Spektren. Sie werden daher als Ausreißer indiziert.

Zweitens, der größte Anteil an biochemisch gebundenem P liegt innerhalb der Zellen in stark kondensierten Nukleinsäuremolekülen also als DNA und RNA vor. Die direkte Quantifizierung von Nukleinsäuren in Zellen anhand der FTIR-Spektroskopie wird in der Literatur kritisch hinterfragt (Diem et al. 1999). Die hohe Kondensation des Phosphats im Zellkern der Zelle führt zu einer gestörten Linearität zwischen Absorption und Konzentration, wodurch das Lambert-Beersche Gesetz nur noch eine eingeschränkte Gültigkeit besitzt und zuverlässige Quantifizierungen im DNA/RNA Gehalt nicht möglich sind. Da der DNA/RNA-Gehalt in einer Art relativ konstant ist, lässt sich daher das C:P in einer gegebenen Art in ein Modell umsetzen, aber dieses Modell ist nicht für andere Zellarten anwendbar.

Für die Bestimmung der zellinternen C:P Verhältnisse kann abschließend geschlussfolgert werden, dass die Bestimmung anhand von FTIR-Spektren nur für die jeweiligen Arten zuverlässig angewendet werden kann, mit denen das Modell erstellt wurde. Für die Untersuchung weiterer Arten müssen jeweils neue Kalibrationen durchgeführt werden, da sich keine generelle Methode anhand von Modellorganismen erstellen lässt.

II.1.2.3. Bestimmung des C:Si-Verhältnisses

Bacillariophyceen verfügen im Gegensatz zu den meisten anderen Phytoplanktongruppen über eine Kieselschale. Der zelluläre Anteil an Si kann bis zu 30% der Trockenmasse umfassen und kann sich direkt auf die Zellproliferation auswirken. Die Bestimmung des Si-Gehaltes ist daher von großer Bedeutung für die Wachstumsvoraussagen von Bacillariophyceen. Es ist gelungen, ein PLS-Regressionsmodell zur Bestimmung des zellulären Si-Gehaltes zu entwickeln (Abbildung 5). Dies wurde möglich, nachdem eine Referenzmethode für die Bestimmung des zellinternen Si etabliert wurde. Es wurden analog zur Erstellung der C:P und C:N Modelle Chemostat-Kulturen mit unterschiedlichen Si-Konzentrationen angezogen (Tabelle 6), um einen zellulären Si-Mangel zu induzieren und die jeweilige Wachstumsrate zu bestimmen.

Tabelle 6: Si-Nährstoffversorgung der Kulturen von *C. meneghiniana* pro Tag und die daraus resultierende Wachstumsrate.

externe Si-Konzentration [mg l ⁻¹]	Wachstumsrate [μ^{-1}]
0.587	0.376
0.44	0.261
0.294	0.158
0.147	0.075

Dies ermöglichte wiederum die Kalibrierung von FTIR-Spektren in Abhängigkeit von der zellinternen Si-Konzentration und des prozentualen Anteils von Si am Trockenmasse (Abbildung 5). Die Validierung der C:Si Modelle zeigte wiederum eine sehr gute Voraussagewahrscheinlichkeit von $R^2 > 96,2$ und einem Fehler $RMSECV < 0,258$. Die zusätzlich zur Validierung verwendeten Bacillariophyceen *Phaeodactylum tricornutum*, *Thalassiosira weissflogii* zeigten, dass das entwickelte Modell für diese Algengruppe universell einsetzbar ist. Zusätzlich wurde versucht, das Modell auch an anderen silikathaltigen Zellen zu testen. Dabei zeigte sich, dass die Vorhersage des Si:TM bei *Synura petersenii* (silikathaltige Synurophyceae) nicht möglich war. Die erstellte FTIR-Methode gab Werte aus, die weit über dem colorimetrisch bestimmten Si-Gehalt [% TM] lagen (Abbildung 5). Mit diesem Modell ist also die Vorhersage des Si-Gehalts aller hier verwendeten Diatomeen möglich. *S. petersenii*, die zu den Chrysophyta gehört, konnte jedoch über dieses Modell nicht mit erfasst werden.

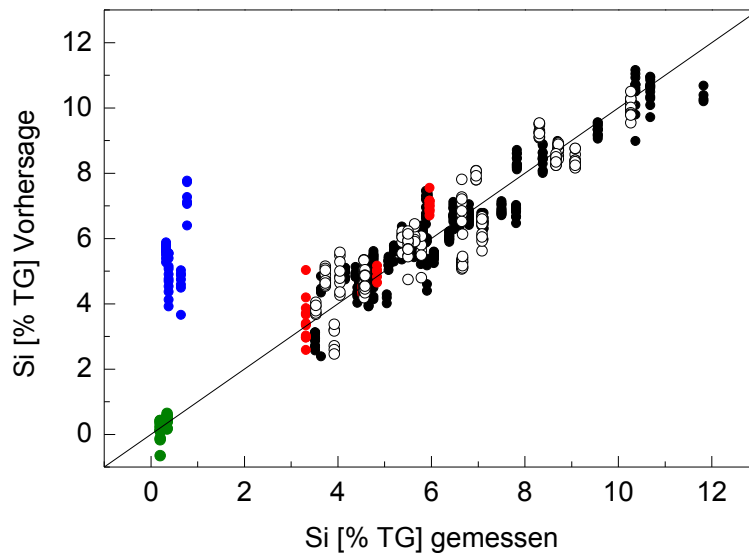


Abbildung 5: Kreuzvalidierung des zellulären Silizium-Gehalts [% TM] von *C. meneghiniana* (schwarz geschlossene Kreise), *S. costatum* (schwarz offene Kreise), *P. tricornutum* (grün) sowie die Validierung des Modells anhand unbekannter Proben von *T. weissflogii* (rot) und *S. petersenii* (blau).

II.1.2.4. Alternative Möglichkeit die Wachstumsraten zu bestimmen.

Die Ergebnisse zeigten, dass man mit Hilfe der FTIR Spektroskopie zuverlässig C:N, mit Einschränkungen C:P und in Bacillariophyceen C:Si Verhältnisse bestimmen kann. Somit konnten bereits Methoden erstellt werden, mit denen eine nährstofflimitierte Wachstumsrate modelliert werden kann. Da sich der nährstoffbedingte zelluläre Ernährungszustand der Zellen innerhalb eines FTIR-Spektrum direkt widerspiegelt, konnte zusätzlich die Wachstumsrate direkt mit den FTIR-Spektren korreliert werden. Trotz der aufwändigen Anzuchtsbedingungen für die einzelnen Gruppen, konnten diese Modelle für alle drei untersuchten Großgruppen unter verschiedenen Nährstoffmangelbedingungen erstellt werden. Exemplarisch werden drei dieser Modelle für die untersuchten Modellorganismen unter N-Mangel dargestellt (Abbildung 6). Die hier erzielten Ergebnisse zeigen, dass die FTIR-Spektroskopie eine ideale Methode darstellt, um nährstoffabhängiges Wachstum charakterisieren zu können.

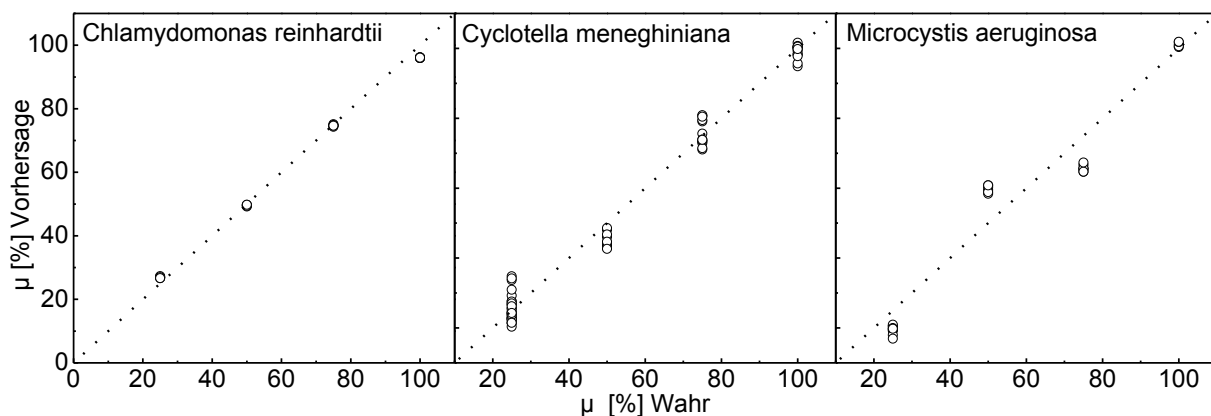


Abbildung 6: Kreuzvalidierung des PLS-Regressionsmodelle zur Bestimmung der Wachstumsrate μ

II.1.3 Einzelzelltechnik und Mikroskop-gekoppelte FTIR Spektroskopie

In diesem Abschnitt sollte ermittelt werden, ob die von Einzelzellmessungen ermittelten FTIR Spektren geeignet sind, um die zelluläre Nährstoffkonzentration einzelner Vertreter des Phytoplankton zu bestimmen, wenn die Spektrenauswertung auf der Grundlage der Labormodelle erfolgt. Hierzu mussten von den verwendeten Modellorganismen sowohl Mikroskop-gekoppelte FTIR-Spektren sowie Spektren auf dem Mikrotiterplattenmodul aufgenommen werden. Für die Mikroskop-gekoppelte FTIR-Spektroskopie wurde ein für diesen Zweck adaptiertes FTIR-Gerät unter Anleitung des IGB konzipiert, von der Firma Resultec (Resultec analytic equipment, Illerkirchberg) technisch umgesetzt und vom Fraunhofer Institut (Stuttgart) getestet.

II.1.3.1. Probenaufbereitung

Die Probenaufbereitung für die Einzelzellmessungen mittels FTIR-Spektroskopie erfolgte analog zu dem Probenaufbereitungsverfahren für die mikrotiterplattengekoppelte FTIR-Spektroskopie. Als Probenträger diente hier ein speziell beschichteter Objektträger, dessen Beschichtung normale lichtmikroskopische Arbeiten erlaubt, die IR-Strahlung jedoch komplett reflektiert. Die aufgebrachte Probe wurde nach der mikroskopischen Analyse ebenfalls bei 40°C eingetrocknet und anschließend vermessen.

II.1.3.2. Entwicklung und Testung der Hardware der Einzelzellspektroskopie

In Zusammenarbeit mit dem IGB sollte die Mikroskop-gekoppelte FTIR-Spektroskopie technisch so weiterentwickelt werden, dass Freilandproben ohne größeren Aufwand auf speziellen Objektträgern spektroskopisch vermessen werden können. Das zu entwickelnde Gerät wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Resultec (Dr. Feustel) und dem Fraunhofer Institut (Stuttgart, Dr. Müller) konzipiert. Dazu wurde zunächst der Stand der Geräteentwicklung für Infrarotmessungen an mikroskopischen Proben sondiert, um den Anforderungen an ein geeignetes infrarotspektroskopisches Messsystem zur Einzelzellanalytik gerecht zu werden. Es sollte über eine ausreichende optische Qualität zur Unterscheidung verschiedener Spezies, sowie über eine hohe laterale spektroskopische Auflösung verfügen, die eine Messung von Einzelzellen erlauben und eine ausreichende Intensität des spektroskopischen Signals ermöglichen. Zudem sollte die Hardware hinsichtlich des Kostenaufwandes so gering gehalten werden können, dass später das Setup auch in der Gewässeranalytik eingesetzt werden kann. Schließlich musste die Handhabung so bedienerfreundlich sein, dass auch nicht spektroskopisch-geschultes Fachpersonal in der Lage ist, das System zu bedienen. Am besten wurden die genannten Anforderungen von einem Messsystem der Firma Resultec erfüllt, die dann von der Universität Leipzig den Auftrag erhielt.

Das System (Abbildung 7) besteht aus einem Lichtmikroskop (Olympus BX41), an welches das Spektrometer-Modul (IlluminatIR) angebaut wurde; einem Objektiv-Revolver mit einem 10x Objektiv, einem IR-tauglichen Schwarzschild 10x-Objektiv und einem IR-tauglichen 36x-Diamant-ATR-Objektiv; einer Heiz- und Kühlkammer mit Flüssigstickstoff-Einrichtung (FDCS 196) und einem Temperaturregler (TMS94V); Software zur Spektrenerfassung (QualID), zur Spektrenauswertung (GRAMS) sowie zur Kamera- und Temperatursteuerung (Linksys).

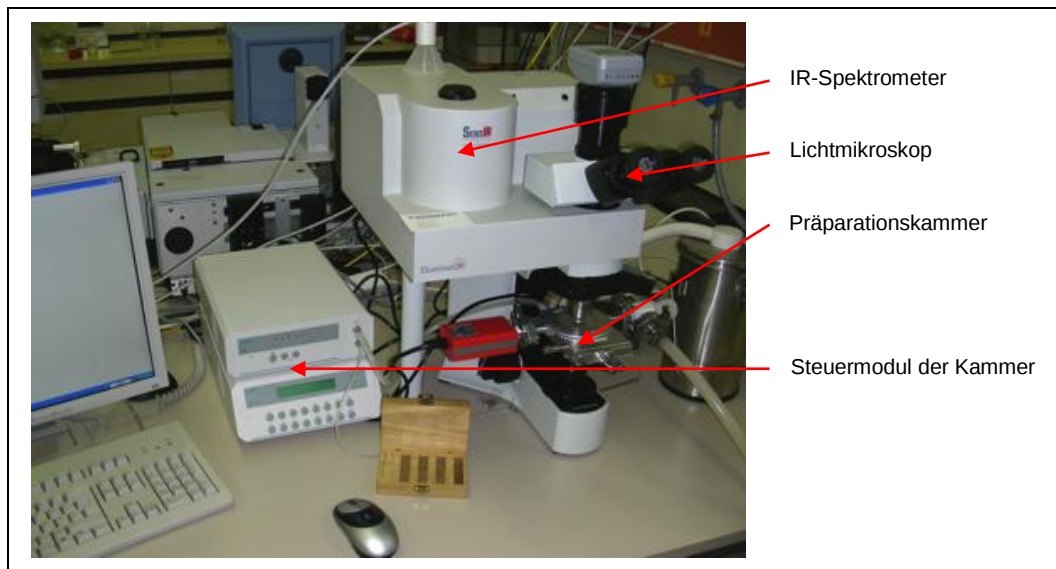


Abbildung 7: Aufbau des Messsystems der Firma Resultec mit Spektrometer-Modul (IlluminatIR), Lichtmikroskop (Olympus BX41), Präparationskammer und dem Steuermodul.

Der Objektträger ist in der speziell gefertigten Präparationskammer fixiert (Abbildung 8). Der Probenhalter verfügt über ein steuerbares Peltier-Element, welches ein computergesteuertes Aufheizen der Probe ermöglicht, ohne das gewünschte Objekt aus dem Strahlengang zu entfernen. Die für die Mikrotiterplatten verwendete Trocknung kann somit direkt unter dem Mikroskop erfolgen. Alternativ verfügt die Probenkammer über ein System zum Aufbau eines Vakuums, welches durch eine Hochleistungspumpe erzeugt wird. Das Peltier-Element ist in der Lage die Probe auf bis zu -40°C einzufrieren, wodurch in Kombination mit dem Vakuum eine Gefriertrocknung der Probe direkt auf dem Objektträger erfolgen kann. Nachdem eine Probe auf den Objektträger aufgetragen wurde, kann der gewünschte Messbereich im Mikroskop erfasst und simultan über eine Digitalkamera verfolgt und dokumentiert werden. Hierfür stehen 4 verschiedene Blenden zur Verfügung ($12\text{ }\mu\text{m}$, $25\text{ }\mu\text{m}$, $50\text{ }\mu\text{m}$ und $100\text{ }\mu\text{m}$), die es erlauben den Messbereich auf eine gewünschte Größe einzuengen. Nachdem die Probe unter dem Mikroskop justiert wurde, erfolgt die Trocknung mit einer der beiden Optionen (Heizen oder Gefriertrocknung). Anschließend kann das FTIR-Spektrum in Transflexion (im Unterschied zur Transmissionsmessung des Mikrotiterplattenmoduls) gemessen werden. Dies bedeutet, dass der IR-Strahl in den Strahlengang des Mikroskops und dann auf den Objektträger geleitet wird. Dort durchstrahlt er die Probe, um anschließend an dem für IR-Strahlen undurchlässigen

Objektträger reflektiert zu werden. Der reflektierte Strahl durchstrahlt die Probe dann ein zweites Mal und wird dann über Spiegel zum Detektor gelenkt. Das Meßsignal wird mittels der Standardsoftware GRAMS (Thermo Scientific) für FTIR-Geräte verarbeitet und ausgewertet.

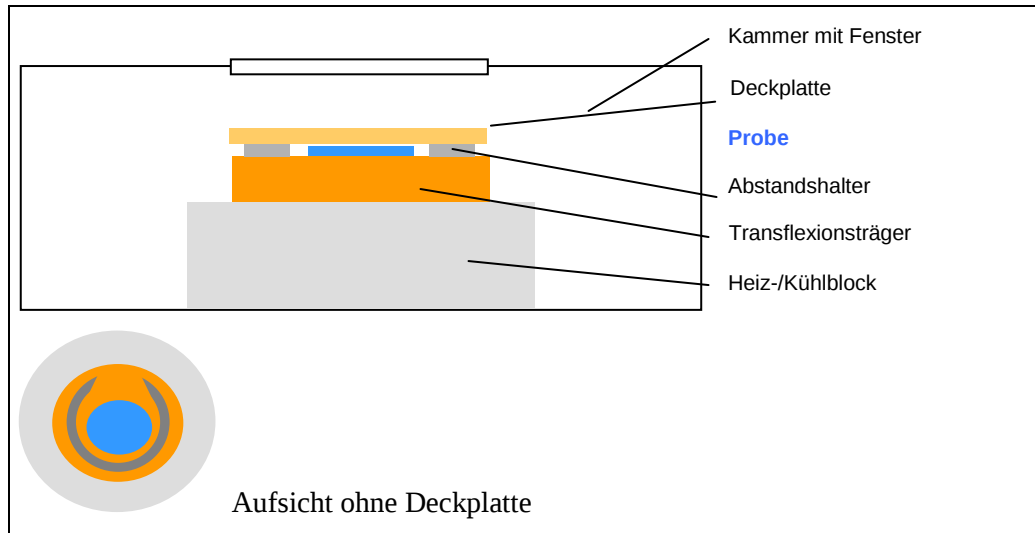


Abbildung 8: Schematischer Aufbau in der Präparationskammer für das Lichtmikroskop (Olympus BX41).

Nachdem das Gerät am IGB aufgebaut wurde, wurden im Rahmen der Kooperation erste Messungen durchgeführt, um das Gerätesetup zu testen und zu optimieren. Hierzu wurden verschiedene Modellorganismen von der Universität Leipzig bereitgestellt. Neben den verschiedenen Hardwareeinstellungen wurden auch die verfügbaren Blenden getestet, um ein möglichst gutes Messsignal im Verhältnis zu dem vermessenen Durchmesser zu erhalten. So kann mit einem kleinen Blendendurchmesser der Messbereich auf die Größe von Einzelzellmessungen eingengt werden und mit größeren Blenden Zellaggregate vermessen werden. Das Messsignal nimmt jedoch ab, umso kleiner der Blendendurchmesser ist. Durch das angekoppelte Kamerasystem kann die Probe zu jedem Zeitpunkt visuell überwacht werden und somit eine Identifizierung der vermessenen Zellen erfolgen. Die Probentrocknung erfolge über die Option der Gefriertrocknung. Bei einem Probenvolumen von 1 µl dauerte dieser Vorgang 15-20 min. Die alternative Trocknung durch Heizen des Peltier-Elements ist innerhalb von 3 min abgeschlossen, woraus geschlussfolgert werden kann, dass die Methode des Aufheizens der Gefriertrocknung vorzuziehen ist.

Im Folgenden ist am Beispiel von *Chlamydomonas* eine Aufnahme mit der kleinsten verfügbaren Blende (12 µm, die Einzelzellen haben Durchmesser von ca. 5-10 µm) an unterschiedlichen Probenpositionen, einem Bereich mit Zellhaufen und einem Bereich mit vereinzelt Zellen, gezeigt (Abbildung 9). Der Vergleich zu einem Spektrum das mittels Mikrotiterplatten-gekoppelter FTIR-Spektroskopie erstellt wurde, zeigt eine gute Übereinstimmung der beiden Spektren (Abbildung 9). Die Abweichungen zwischen den Spektren im Kohlehydratbereich sind relativ gering und können auf die unterschiedliche Optik der beiden Geräte zurückgeführt werden. Größere Abweichungen konnten

in den Bereichen außerhalb der für die Modelle verwendeten Wellenzahlen beobachtet werden. Dies ist auf durch die deutlich erhöhte Mie-Streuung der Proben bei der Messung im Mikroskop zu erklären (Bassan et al. 2009). Eine mathematische Lösung für die Korrektur dieser Mie-Streuung wurde vor kurzem publiziert (Bassan et al. 2010). Für eine Fortsetzung der Methodenanalyse muss untersucht werden, ob die Anwendung dieser Korrektur zu besseren Ergebnissen führt.

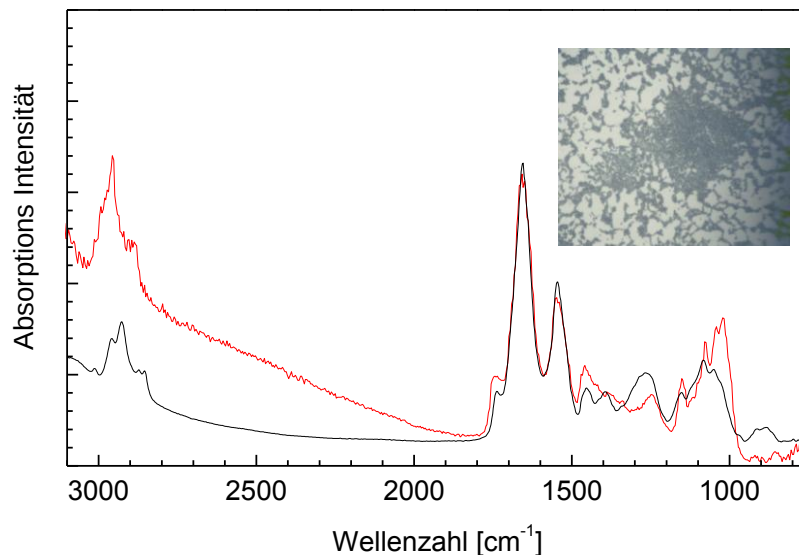


Abbildung 9: Mikroskop-gekoppeltes FTIR-Spektrum von *Chlamydomonas reinhardtii* (rot) mit einer 12 µm Blende im Vergleich zu (schwarz) einem FTIR-Spektrum auf Mikrotiterplatte gemessen. Das Foto zeigt den Objektträger mit den Abmessungen von 1mm x 0.8mm. Die IR-Messung erfolgt im Zentrum des Bildausschnitts.

Es konnte also gezeigt werden, dass mit der kleinsten verfügbaren Blende Spektren mit ausreichender Signalintensität erhalten werden können. Bei vereinzelt Zellen ist es jedoch, auch über das Okular des Lichtmikroskops mit 10x Objektiv, sehr schwierig die Position einzustellen, an der die IR-Aufnahme stattfindet. Die Messgenauigkeit des Gerätes ist für Einzelzellen mit einer Größe unter 12µm noch nicht ausreichend. Es wurde daher versucht, ausschließlich Zellaggregate anstelle von Einzelzellen zu vermessen.

Nachdem die Geräteeinstellungen definiert waren, konnten Spektren verschiedener Algen mit dem optimierten Setup aufgezeichnet werden (Abbildung 10). Hier zeigte sich, dass die erwarteten Spektren mit den artspezifischen Charakteristika der FTIR-Spektren gemessen und für alle bisher untersuchten Großgruppen verwendet werden können.

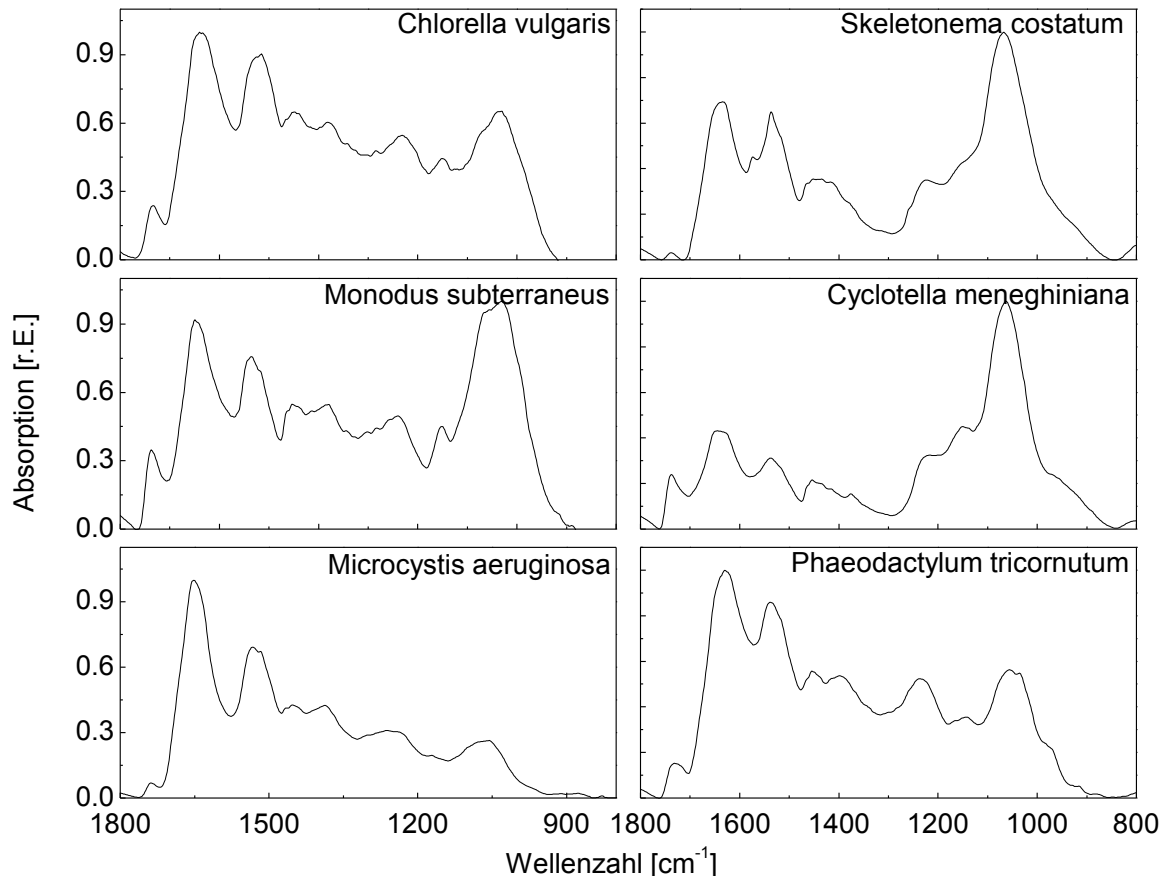


Abbildung 10: FTIR-Spektren von Mikroskop-gekoppelter IR-Spektroskopie verschiedener Algen.

II.1.3.3. Mikroskopspektren im Vergleich zu Mikrotiterplattenspektren

Alle Modelle zur Bestimmung der zellinternen Nährstoffverhältnisse wurden mittels der mikrotiterplattengekoppelten FTIR-Spektroskopie erarbeitet. Daher musste getestet werden, ob die vorhandenen PLS-Regressionsmodelle in Proben deren FTIR-Spektren mittels Mikrotiterplattenmodul und Mikroskop-gekoppelter FTIR gemessen wurden, gleiche Ergebnisse liefern. Dies war deshalb nicht trivial, weil die Messgeometrie in den beiden Geräten unterschiedlich ist. Während beim Mikrotiterplattenmodul das IR-Spektrum im Transmissionsmodus gemessen wird, erfolgt in der Mikroskop-gekoppelten Variante die Spektrenaufnahme im Transflexionsmodus. Dieser Unterschied wirkt sich insbesondere in der Streuung aus. Exemplarisch werden hier die Ergebnisse von zwei ausgewählten Proben dargestellt, welche die Spektren der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* und der Kieselalge *Cyclotella meneghiniana* umfassen (Abbildung 11).

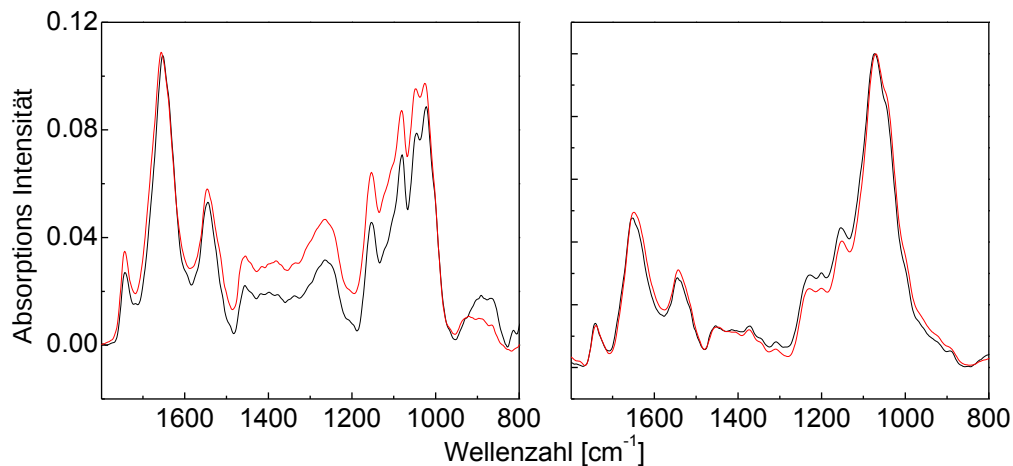


Abbildung 11: Vergleich von Mikroskop-gekoppelten FTIR-Spektren (rot) und FTIR-Spektren gemessen mittels HTS-XT-Mikrotiterplattenmodul (schwarz) von (A) *Chlamydomonas reinhardtii* unter N-Mangelbedingungen und (B) *Cyclotella meneghiniana*.

Auch wenn die Spektren zwar die gleiche Charakteristik aufwiesen, so zeigten sich aber auch deutliche, insbesondere bei der Vermessung der Grünalge. Die anschließende Anwendung der PLS-Regressionsmodelle zeigte dann erfreulicherweise eine gute Übereinstimmung der berechneten C:N, C:P und Si Verhältnisse sowie des Wachstumspotentials [μ] (Tabelle 7). Es konnte somit geschlussfolgert werden, dass die mit dem Mikrotiterplattenmodul erstellten Modelle auf die Spektren des Mikroskop-gekoppelten FTIR-Spektrometers übertragbar sind.

Tabelle 7: Die Bestimmung zellulärer Elementarverhältnisse und der Wachstumsrate anhand von PLS Regressionsanalysen am Beispiel der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* unter N-Mangelbedingungen. FTIR-Spektren der Algenkultur gemessen mittels HTS-XT Mikrotiterplattenmodul im Vergleich zu Mikroskop-gekoppelten FTIR-Spektren. Die Ergebnisse beider Methoden wurden mittels t-Test auf signifikante Unterschiede getestet ($\alpha = 0.01$).

		HTS-XT	Mikroskop	t-Test [p-Wert]
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	C:N	11,28 $\pm$ 0,17	11,23 $\pm$ 0,05	0,38 (n.s.)
	C:P	365,54 $\pm$ 11,34	394,87 $\pm$ 31,9	0,04 (n.s.)
	μ	43,99 $\pm$ 1,52	41,71 $\pm$ 1,25	0,05 (n.s.)
<i>Cyclotella meneghiniana</i>	C:N	8,61 $\pm$ 0,37	9,66 $\pm$ 0,83	0,09 (n.s.)
	C:P	222,85 $\pm$ 32,35	168,21 $\pm$ 52,54	0,007 (*)
	P [% TM]	0,13 $\pm$ 0,03	0,16 $\pm$ 0,02	0,08 (n.s.)
	P [pg/Zelle]	0,14 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,01	0,11 (n.s.)
	Si [%TM]	3,81 $\pm$ 1,5	2,72 $\pm$ 0,99	0,30 (n.s.)
	μ	99,45 $\pm$ 7,73	78,44 $\pm$ 7,97	0,03 (n.s.)

II.1.3.4. Vergleichende Messungen mittels energiedispersiver Röntgenmikroanalyse (EDX)

Um die Zuverlässigkeit der mittels IR-Spektroskopie bestimmten C:P und C:N Verhältnisse in Phytoplanktonzellen abschätzen zu können, wurden durch den Kooperationspartner am IGB Elementanalysen mittels EDX durchgeführt. In Kombination mit einem Elektronenmikroskop können die getrockneten Proben zunächst betrachtet werden. An ausgewählten Stellen kann dann eine Röntgenmikroanalyse durchgeführt werden, wobei das Informationsvolumen ca. $1 \mu\text{m}^3$ beträgt. Als Beispiel wurden fixierte Zellen von *Cyclotella meneghiniana* in vier verschiedenen Konzentrationen auf Aluminiumplättchen immobilisiert. Um einen Eindruck von der Verteilung der Zellen zu erhalten, wurden von jeder der vier Proben Aufnahmen in 250-, 500- und 1.000-facher Vergrößerung durchgeführt. Bei einer Elektronenbeschleunigungsspannung von 8 kV wurden folgende Elemente bestimmt: O, Al (Substrat), Na, Mg, Si, Cl, geringe Mengen an N, P und S sowie Pt (Sputtermaterial). Eine Auswertung der Spektren zeigte, dass mit EDX die Elementverhältnisse zwar bestimmt werden können, jedoch der Fehler je nach Element sehr unterschiedlich ausfallen kann. Die daraus berechneten Verhältnisse sind in Tabelle 8 den Werten der FTIR-Analyse gegenübergestellt. Der Wert für P und das daraus bestimmte C:P Verhältnis ist allerdings mit einem großen Fehler behaftet, da das P-Signal mit dem des Pt zum Teil überlagert ist. Andere Materialien zur Probenbedampfung wie Pd:Au, Au oder C sind ungeeignet, da zu viele Linien im Bereich der interessierenden Elemente vorhanden sind. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die bestimmten internen Nährstoffverhältnisse eine gute Übereinstimmung mit den gemessenen Nährstoffkonzentrationen zeigten (siehe Abbildung 3 und Abbildung 4). Das C:P Verhältnis wurde jedoch unterschätzt, was auf die Überlagerung des P-Signals zurückzuführen ist.

Tabelle 8: Elementarverhältnisse von *C. meneghiniana* ohne Nährstofflimitierung gemessen mit EDX im Vergleich zur Messung mittels FTIR-Spektroskopie.

Nährstoffverhältnis	EDX	FTIR-Spektroskopie
C:N	11.9	8.3 ± 1.5
C:P	169.9	250.1 ± 4.9
C:Si	4.2	4.8 ± 0.3

II.1.4. Anwendung der FTIR Spektroskopie an Freilandphytoplankton

Nachdem die Anwendbarkeit der PLS-Regressionsmodelle auf die Mikroskop-gekoppelten Spektren getestet wurde, sollte eine Methode erarbeitet werden, wie aus Freilandproben, die aus einer komplexen Matrix von verschiedenen Phytoplankton-, und Zooplanktonzellen sowie einen Großteil an Detritus bestehen, IR-Spektren der Phytoplanktonzellen erstellt werden können. Hierfür musste zuerst die Probenaufbereitung um einige Teilschritte ergänzt werden. Nach der Probennahme folgte eine

erste Filtration, um große Schwebstoffe sowie Zooplankton zu entfernen. Anschließend wurden die Proben in einem weiteren Filtrationsschritt konzentriert. Ist die Messung dieser Probe aus logistischen Gründen nicht unmittelbar nach der Probennahme möglich, wurden die Proben mit Lugolscher Lösung fixiert. Die so aufkonzentrierten und teilweise fixierten Proben wurden anschließend im Labor mit dem Standardprobenaufbereitungsverfahren (siehe Kapitel II.1.1) für die Messung aufgearbeitet. Zusätzlich wurde die Auswirkung der Fixierung mittels Lugolscher Lösung untersucht.

Die weitere Entwicklung der Methode zur Vermessung von Freilandproben umfasste dann mehrere Teilabschnitte. Ziel dieser Arbeiten war, die Gesamtpopulation, darin enthaltene Großgruppen aus und Einzelzellen aus Freilandproben mittels FTIR-Spektroskopie zu vermessen. Hierzu standen zwei verschiedene Spektroskopieverfahren zur Verfügung, welche beide vergleichend untersucht wurden. So sollten die Proben mittels Mikrotiterplattenmodul gemessen werden und eine Methodenentwicklung für die Mikroskop-gekoppelte FTIR-Spektroskopie an Freilandproben erfolgen. Die ersten Messungen zeigten, dass die Messung ganzer Populationen schwierig ist (II.1.4.1) und eine direkte Mikroskop-gekoppelte FTIR-Analyse ebenfalls nicht möglich ist (II.1.4.2). Daher wurde ein Verfahren basierend auf der Fluoreszenz gestützten Zellsortierung (FACS) verwendet, um die einzelnen Gruppen zunächst zu trennen und dann IR-spektroskopisch zu vermessen (II.1.4.3). Die Freilandproben, welche für diesen Teilabschnitt des Projektes verwendet wurden, stammten entweder aus umfangreichen Probennahmen der Bundesanstalt für Gewässerforschung (BfG), oder aus einem eutrophen lokalen Gewässer (Auensee Leipzig). Die BfG lieferte im Rahmen der Kooperation Proben von den Fließgewässern Mosel, Elbe und Havel. Insgesamt umfassten diese Probennahmen 120 Proben von 8 unterschiedlichen Bereisungen im Laufe der Jahre 2008-2009.

II.1.4.1 FTIR-Spektroskopie von Freilandproben auf Mikrotiterplatten

Für die Anwendung der entwickelten Modelle wurden zuerst FTIR-Spektren der Gesamtpopulation auf Mikrotiterplatten vermessen. Hierbei zeigte sich wie erwartet, dass aufgrund unterschiedlicher Algenzusammensetzung große Unterschiede innerhalb der Spektren messbar sind. Die Spektren lassen sich am Beispiel unterschiedlicher Standorte der Elbe in 2 Cluster unterscheiden (Abbildung 12). So waren zum Zeitpunkt der Probennahme einige Standorte von Bacillariophyceen dominiert, was aufgrund des eindeutig zu identifizierenden Si-Peak erkenntlich war. Im Gegensatz dazu konnten an anderen Probenahmepunkten ein hoher Anteil an nicht Si-haltigen Algen nachgewiesen werden. Da es sich jedoch in beiden Fällen um Mischpopulationen handelte, konnte anhand dieser Spektren keine Aussage über die zellinterne Nährstoffkonzentration errechnet werden. Zwar lassen sich anhand der FTIR-Spektroskopie Aussagen über die Populationsstruktur machen (Algenblüten einzelner Großgruppen), für die Bestimmung der Nährstoffverhältnisse muss jedoch ein anderer experimenteller Ansatz verwendet werden. Dies zeigt die Notwendigkeit der Mikroskop-gekoppelten FTIR-Analyse, die in der Lage ist, taxonomisch unterschiedliche Zellen getrennt zu messen.

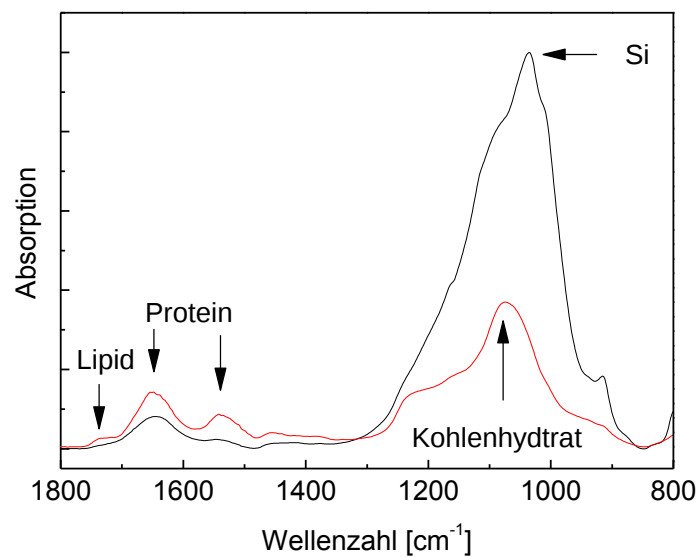


Abbildung 12: FTIR-Spektren von Freilandproben der Elbe gemessen auf Mikrotiterplatten. (schwarz) Probenstandort 1 bei Lühort zeigt eine Phytoplanktonstruktur, welche stark durch Bacillariophyceen dominiert wird. (rot) Probenstandort 2 bei Geesthacht zeigt vergleichsweise wenige Bacillariophyceen wie an dem schwach ausgeprägten Si-Peak erkennbar ist.

II.1.4.2 Direkte Mikroskop-gekoppelte FTIR-Spektroskopie an Freilandproben

Die einfachste Möglichkeit der Vermessung von Freilandproben besteht darin, die vorbehandelten Proben direkt im Mikroskop zu vermessen, ohne eine weitere Auftrennung der Großgruppen technisch umsetzen zu müssen. Erste Messungen am Beispiel der Mosel zeigten die Möglichkeiten der Mikroskop-gekoppelten FTIR-Spektroskopie. Die Proben der Mosel wurden zu einem Zeitpunkt genommen, an dem eine starke Bacillariophyceen Frühjahrsblüte das Gewässer beherrschte. Dementsprechend befanden sich in der Probe fast ausschließlich Algen derselben Großgruppe, was die FTIR-Spektroskopie direkt an der Probe ermöglichte (Abbildung 13). Hierbei konnte ein typisches Bacillariophyceen-Spektrum gemessen werden, was sich durch einen hohen Si-Peak auszeichnet. Im Laufe des Projektes zeigte sich jedoch, dass die direkte Messung von Freilandproben im Mikroskop durch einige Faktoren eingeschränkt wird. Die Signalstärke der FTIR-Messung ist mit dem verwendeten Setup zu schwach für Einzelzellmessungen (vergleiche II.1.3.2). Es erforderte demnach größere Zellhaufen derselben Algengruppe zur Aufnahme eines FTIR-Spektrums mit ausreichender Signalstärke. Da in natürlichen Freilandproben nur selten eine Großgruppe das Phytoplankton beherrscht, wie es zur Frühjahrsblüte in der Mosel der Fall war, ist die saubere Messung einzelner Großgruppen mit ausreichend Zellen im Messfeld nicht durchführbar. Überlagerungen und Durchmischung anderer Großgruppen können nicht vermieden werden. Die erhaltenen Spektren lassen sich anschließend nicht zuverlässig mit den Modellen zur Bestimmung der Nährstoffgehalte

auswerten. Daher ist die Sortierung der einzelnen Großgruppen mittels Fluoreszenz gekoppelter Zellsortierung unvermeidbar, um dieses Problem zu lösen.

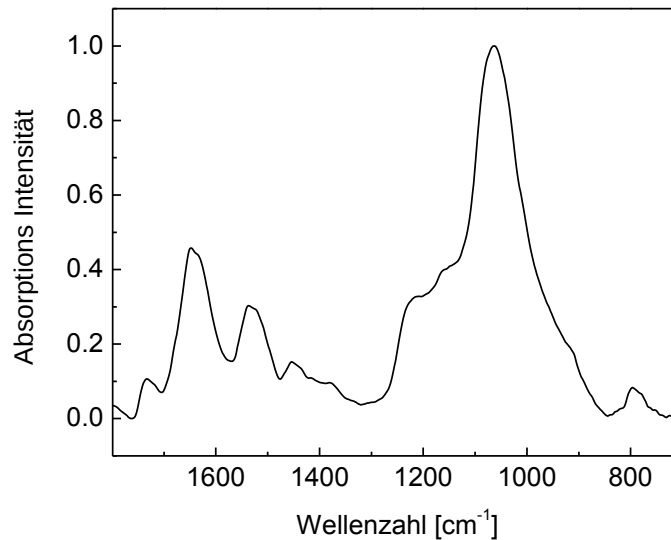


Abbildung 13: Mikroskop-gekoppelte FTIR-Spektrum einer Freilandprobe während der Bacillariophyceen-Frühjahrsblüte der Mosel 2008.

II.1.4.3 Fluoreszenz gekoppelte Zellsortierung (FACS) als Methode für die Probenvorbereitung

Um das Signal zu Rausch-Verhältnis der FTIR-Spektren zu verbessern und die Überlagerungen verschiedener Algengruppen untereinander und mit Detritus zu vermeiden, wurde versucht, die Algen vor der IR-Messung mittels Flowzytometer in einzelne Algengruppen zu sortieren.

Hierfür wurde ein Flowzytometer (BD FACS ARIA II) verwendet, das mit speziell für die Phytoplanktonanalyse angepassten Lasern arbeitet. Es werden die spezifischen Fluoreszenzen der unterschiedlichen Photosynthesepigmente angeregt und deren Fluoreszenzen bei definierten Wellenlängen detektiert (Tabelle 9). Anhand von Markerpigmenten der einzelnen Algengruppen, können diese Gruppen von einander unterschieden werden (Abbildung 14).

Tabelle 9: Übersicht der Anregungs- und Detektionswellenlängen zur Bestimmung der Fluoreszenzparameter im Flowcytometer

Bezeichnung	Anregung [nm]	Detektion [nm]	detektierte Pigmente
Chla (blue)-A	488	670	Chlorophyll a
PC-A	488	505	Phycobiline
PE-A	532	575	Phycobiline

Cyanobakterien lassen sich anhand der Phycobilinfluoreszenz leicht von anderen Gruppen trennen, während weitere Algengruppen anhand ihres Chl a zu Chl b Verhältnis unterschieden werden können.

Anschließend können die jeweiligen Gruppen in einzelne Gefäße sortiert werden. Die Laserkonfiguration und die spektralen Eigenschaften der Zellen, die die Grundlage der Zellidentifizierung und Trennung bilden, ist in der Methodenpublikation Toepel et al. (2004) erläutert.

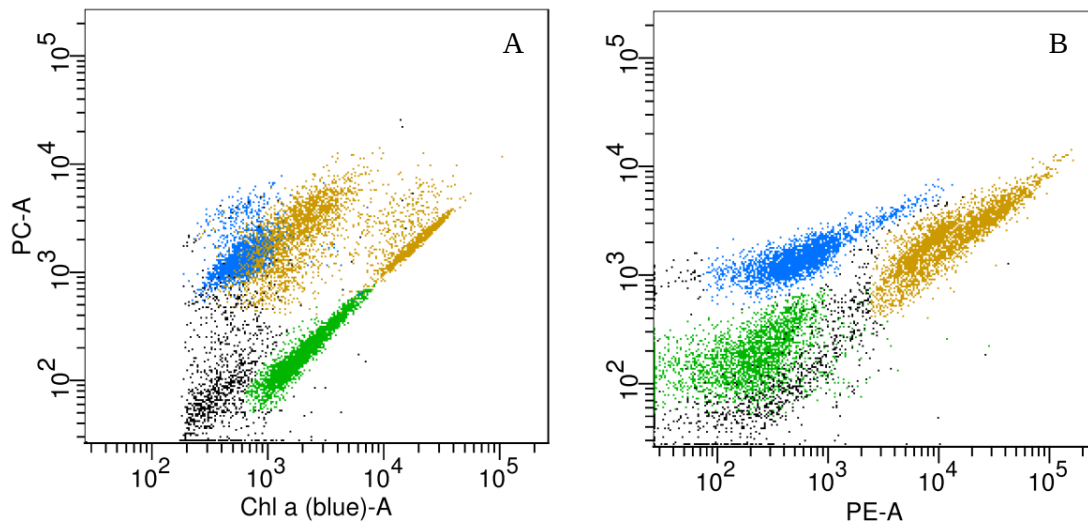


Abbildung 14: Fluoreszenzemission von Phytoplanktonzellen einer artifizierten Mischkultur aus drei verschiedenen Algentaxa. Phycocyanin abhängige Fluoreszenz in Abhängigkeit von (A) der Chlorophyllfluoreszenz sowie (B) der Fluoreszenz durch Phycoerythrinanregung. (Blau: Cyanobakterien; Grün: Grünalgen; Braun: Kieselalgen; Schwarz: Zellreste). Die Erläuterung der Fluoreszenzparameter sind der Tabelle 9 zu entnehmen.

Zur Bearbeitung der Freilandproben mit der Zellsortierung als vorbereitender Methode zur Probengewinnung für die FTIR Spektroskopie wurden überwiegend frische Freilandproben aus einem lokalen eutrophen stehenden Gewässer (Auensee bei Leipzig) verwendet. Im Frühjahr verfügt das Gewässer hauptsächlich über Grünalgen und Cyanobakterien. Bacillariophyceen sind dagegen kaum anzutreffen. Für die beiden ersten Gruppen waren somit genug Zellen vorhanden, um Zellzahlen mittels Flowzytometer zu sortieren, die ausreichen um vergleichende Mikroskop-gekoppelte- und auch mikrotiterplattengekoppelte FTIR-Analysen durchführen zu können. In Abbildung 15 sind die beiden Spektren der Grünalgenfraktion gegenübergestellt. Gute Übereinstimmungen in dem für die Auswertalgorithmen verwendeten Spektrenbereiche zwischen $1700\text{--}800\text{ cm}^{-1}$ zeigten auch für Freilandproben die Vergleichbarkeit der beiden Techniken. Auffällig war das hohe Mie-Streusignal im Bereich von $1700\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ (vergl. Bassan et al. 2009). Dieses Störsignal beeinflusst die mathematische Korrektur der Basislinie, sodass der Lipidanteil bei 1740 cm^{-1} stark unterschätzt wird. Die Auswertung der Spektren zur Bestimmung der zellinternen Nährstoffverhältnisse ist in Tabelle 10 zusammengefasst. Hierbei konnte wiederum beobachtet werden, dass die C:N Modelle gut anwendbar sind und mit einem Fehler von $<15\%$ robuste Ergebnisse liefern. Dies trifft ebenso für die Wachstumsvorhersage μ zu.

Für die Vorhersage der C:P-Verhältnisse können keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden, da besonders bei den Freilandspektren die in Kapitel II.1.2.2 diskutierten Einschränkungen auftreten.

Dabei wurde deutlich, dass für jede Art ein eigenes Modell erstellt werden müsste. Der Vergleich der beiden spektroskopischen Methoden zeigt, dass anhand der Mikroskop-gekoppelten FTIR-Spektroskopie ebenso zuverlässige Daten wie anhand von herkömmlichen Mikrotiterplatten-gekoppelten FTIR-Spektren bestimmt werden können.

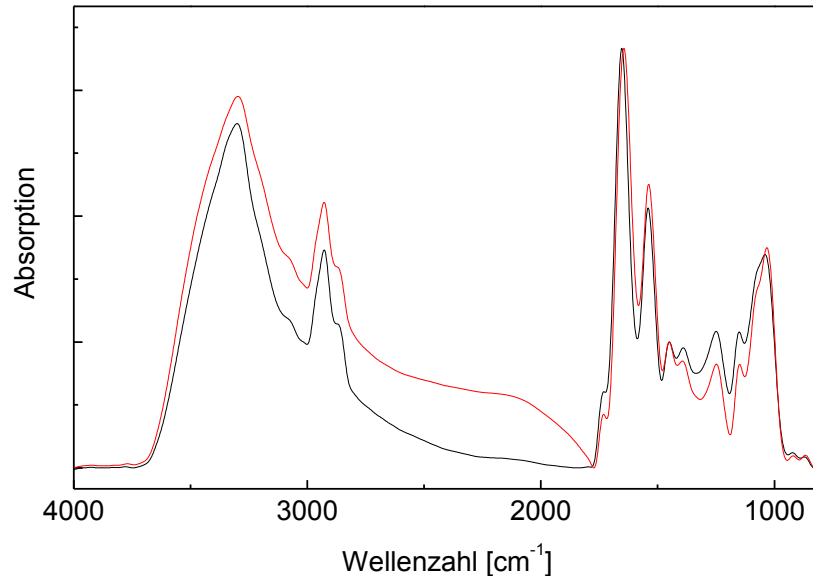


Abbildung 15: FTIR-Spektren der Grünalgenfraktion einer Freilandprobe des eutrophen Leipziger Auensees. Nach der Zellsortierung mittels Flowzytometer wurde die Fraktion auf einer Mikrotiterplatte (schwarz) und im Mikroskop (rot) spektroskopisch vermessen.

Tabelle 10: Zellinterner Nährstoffverhältnisse und Wachstumspotential μ [d^{-1}] der Grünalgenfraktion einer Freilandprobe. Die Nährstoffverhältnisse wurden anhand der FTIR-Spektren und den dafür entwickelten PLS-Regressionsalgorithmen bestimmt (* für dieses Verhältnis konnte kein Wert bestimmt werden, da die mathematische Abweichung des Spektrums zum Modell zu groß ist).

Modell	Mikrotiterplatten-Modul	Mikroskop-Spektroskopie
C:N	5.49	4.31
C:P	21.7*	*
μ [d^{-1}]	0.27	0.29*

Die möglichen Einschränkungen der Zellsortierung durch eine Fixierung mit Lugolscher Lösung mussten ausführlich untersucht werden. Die standardmäßige Fixierungsmethode mit Lugolscher Lösung beeinflusst die Fluoreszenzeigenschaften einzelner Algengruppen und damit die Möglichkeit, die Zellen im Durchflusscytometer zu erkennen und richtig zu sortieren. Insbesondere die Phycobiline der Cyanobakterien zeigten sich als besonders empfindlich. Im Folgenden soll daher dargestellt werden, in welchem Zeitraum eine Fluoreszenz-gekoppelte Zellsortierung fixierter Proben zuverlässig durchgeführt werden kann. Dazu wurden wiederum artifizielle Mischungen von Laborkulturen

verwendet, welche im Abstand von 7 und 14 Tagen nach der Fixierung mit 0.5% Lugolscher Lösung vermessen wurden. Bei der Sortierung mittels Flowzytometrie zeigen sich bereits nach 7 Tagen deutliche Unterschiede im Vergleich zu unfixierten Proben (Abbildung 16). Während die Grünalgen einen deutlich abgegrenzten Cluster bilden und somit sauber sortiert werden können, sind die Diatomeen und Cyanobakterien nicht mehr eindeutig voneinander trennbar. Aus diesen Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass die Sortierung und somit die FTIR-Messung innerhalb von 7 Tagen nach der Fixierung möglich ist.

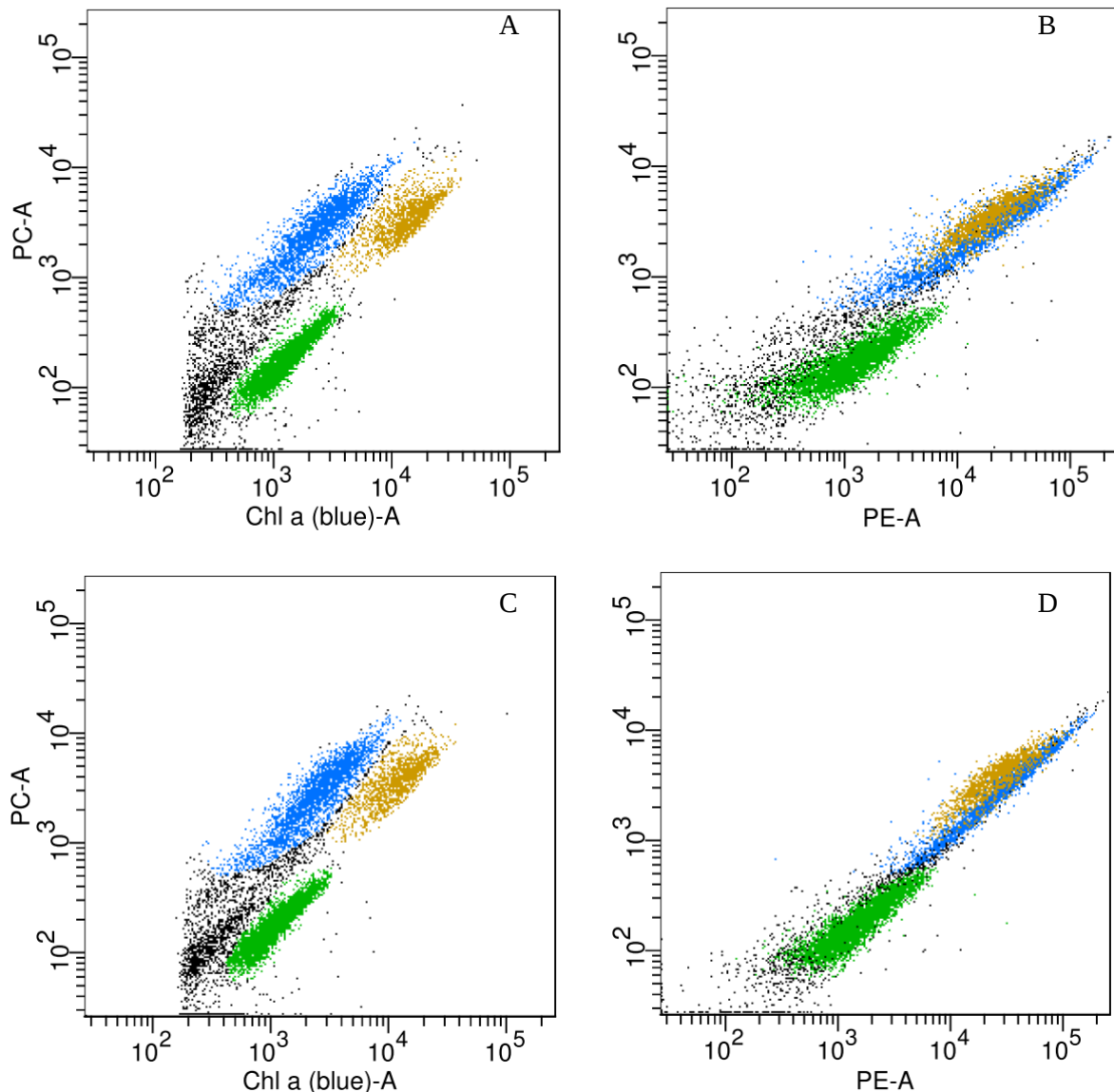


Abbildung 16: Auswirkungen der Fixierung mit Lugolscher Lösung auf die Fluoreszenzemission von Phytoplanktonzellen einer artifiziiellen Mischkultur aus drei verschiedenen Algentaxa. Phycocyanin abhängige Fluoreszenz in Abhängigkeit von (A: 7 Tage fixiert, C: 14 Tage fixiert) der Chlorophyllfluoreszenz sowie (B: 7 Tage fixiert, C: 14 Tage fixiert) der Fluoreszenz durch Anregung von Phycoerythrin. (Blau: Cyanobakterien; Grün: Grünalgen; Braun: Kieselalgen; Schwarz: Zellreste). Die Erläuterung der Fluoreszenzparameter sind der Tabelle 9 zu entnehmen.

Das Ziel der Methodenentwicklung, von Freilandproben mittels FTIR-Spektroskopie die zellulären Nährstoffverhältnisse zu bestimmen, konnte für das C:N Verhältnis erfolgreich erfüllt werden. Das neue FTIR-Spektrometer ist speziell für diese Aufgabe ausgelegt worden und ist nach der ausgiebigen Optimierung einsatzbereit. Die Methode ist aber noch zwingend an eine Sortierung mittels Flowzytometrie gekoppelt. Da die Flowzytometrie jedoch sensitiv auf fixierte Proben reagiert, wird empfohlen, die Messung innerhalb von 7 Tagen nach der Probenfixierung durchzuführen.

II.1.5. Verbesserung von Gewässergütemodellen

Für die Abschätzung der Gewässergüte wird von der Bundesanstalt für Gewässerforschung das Modell „QSim“ verwendet, welches einen Phytoplanktonbaustein umfasst. Die Rechenmodelle dieses Bausteins verwenden Minimale und maximale zellinterne Nährstoffverhältnisse und Aufnahmeraten von Algengruppen, wurden jedoch bisher lediglich mit Literaturdaten erstellt. Insbesondere bei der Modellierung der Elbe, wo regelmäßig P-Limitationen auftreten, konnte die beobachtete Biomassebildung des Phytoplanktons nicht einstufig wie bei dem Monod-Modell angenommen, sondern nur 2-stufig unter Annahme eines P-Speichers in den Algen plausibel erklärt werden. Deshalb wurde für QSim der „Droop“-Ansatz mit Nährstoffspeicherung umgesetzt. Die Änderung des zellinternen Nährstoffgehaltes ergibt sich hierbei aus dem zellinternen Nährstoffgehalt, dem minimalen und maximal bestimmten Gehalt sowie der Aufnahmerate des Nährstoffs (Formel 1 und 2).

$$F_N = \frac{Q - Q_{\min}}{Q} \quad \text{Formel 1}$$

$$\frac{dQ}{dt} = V_{\max} * \frac{NS}{k_s + NS} * \left(\frac{Q_{\max} - Q}{Q_{\max} - Q_{\min}} \right) - \mu * Q \quad \text{Formel 2}$$

F_N : Nährstoffabhängigkeit

k_s : Substratkonzentration bei halber maximaler Wachstumsrate

Q : zellinterner Nährstoffgehalt [mg/mg]

$Q_{\min}$: minimaler zellinterner Nährstoffgehalt [mg/mg]

$Q_{\max}$: maximaler zellinterner Nährstoffgehalt [mg/mg]

$V_{\max}$: maximale Aufnahmerate des Nährstoffes

μ : Wachstumsrate [d^{-1}]

Die Wachstumsrate μ nach dem „Droop“-Ansatz berechnet sich anhand von Formel 3.

$$\mu = P_{\text{mittel}} * (Chla : C) * f_T * f_N * f_L * f_H \quad \text{Formel 3}$$

P_{mittel} : mittlere Produktionsrate im Vertikalprofil [mgC/mgChla/h]

T : Temperatur

N : Nährstoffe

L : Licht

H : Hemmung durch Photoinhibition

Im Modell erfolgt die Berechnung der Produktionsrate schichtenweise, indem der Wasserkörper vertikal in Schichten aufgeteilt wird (Dicke der Schicht hängt von der vertikalen Transportgeschwindigkeit der Algen ab), und für jede Schicht die Produktionsrate bestimmt wird. Die Gesamt-Produktionsrate P ergibt sich dann aus der Summe der Produktionsrate in den einzelnen Schichten in Abhängigkeit der Licht- und Absorptionsverhältnisse. Hinzu kommt noch die Berechnung der Temperaturabhängigkeit des Phytoplanktonwachstums unter der Verwendung verschiedener Temperaturoptima.

Die Parametrisierung des Modells QSim sollte mit Messdaten aus dem Labor überprüft werden. Durch Modelle der FTIR-Spektroskopie der Universität Leipzig gelieferte zellinterne Nährstoffverhältnisse, sollten die Grenzen für die Nährstoffspeicherung in QSim neu gesetzt werden. Diese Arbeiten wurden erfolgreich getestet und abgeschlossen.

Die Validierung der neuen Parametrisierung von QSim sollte anschließend mit Hilfe von FTIR-Spektren von Freilandproben überprüft werden. Hierzu wurden durch die BfG umfangreiche Probennahmen durchgeführt und anhand des Protokolls für die Probenvorbereitung bearbeitet. Die fixierten Proben wurden anschließend an die Universität Leipzig überführt und hier vermessen. Diese Auswertung scheiterte aufgrund von zwei Problemen. I. Aufgrund der Verzögerung bei der Methodenentwicklung konnten die Proben der BfG nicht zuverlässig analysiert werden. Die Messung der Gesamtpopulationen erwies sich bis auf Ausnahmen nicht durchführbar (siehe Kapitel II.1.4.1). Auch die direkte Messung der Gesamtproben unterlag zu vielen Einschränkungen (Kapitel II.1.4.2). Die Methode war für Freilandproben nur mit der Verbindung zur Durchflusszytometrie und anschließender Sortierung einsetzbar. Diese unterliegt jedoch der Einschränkung, dass fixierte Proben innerhalb von 14 Tagen vermessen werden müssen. Da hier die Methodenentwicklung erst zum Ende des Projektes abgeschlossen werden konnte, war es nicht möglich die verbliebenen fixierten Proben aus den Vorjahren zuverlässig zu sortieren und anschließend zu vermessen. Es ist geplant noch in diesem Jahr einige neue Proben zu nehmen, um die neuen Methodenentwicklungen zu testen.

II.1.6. Perspektive: FTIR Spektrum als potentielle Wachstumsprädiktoren

Die Nutzung der FTIR-Spektren von Phytoplankton hat ein hohes Potential bei der Voraussage des Wachstumspotentials. Neuere Arbeiten haben gezeigt, dass der Zusammenhang zwischen der Elementarzusammensetzung der Zellen und der Wachstumsrate keineswegs klar ist. Zwar bestimmen die vergleichsweise einfach zu handhabenden Gewässergütemodelle basierend auf Monod (1942), das Populationswachstum anhand eines limitierten Nährstoffs, berücksichtigen aber dabei nicht, dass konstante Elementarverhältnisse sogenannte „Redfield-Ratios“ in der Natur nicht vorkommen. Monod Modelle, welche allein auf der Basis von Redfield-Ratios arbeiten, sind daher kaum nutzbar, um in-situ Wachstumsraten zu bestimmen (Hakanson 2009). Dies bedeutet, dass Modelle so angepasst werden müssen, dass aus einer reinen Abhängigkeit des Wachstums von dem verfügbaren Nährstoff

eine dreidimensionale Darstellung entwickelt werden muss, die auch die internen Nährstoffverhältnisse beachtet. Die Nutzung des Droop-Modells ist ein erster Schritt hin zu dynamischen Modellen welche auch zellinterne Nährstoffgehalte und Nährstoffaufnahmekinetiken betrachtet. Die zellinternen Nährstoffe können bereits jetzt mit Hilfe der entwickelten Methode für einzelne Großgruppen bestimmt werden. Die Arbeiten müssen jedoch ausgeweitet werden, da die hier erstellten Modelle ausschließlich Nährstoffmangelbedingungen berücksichtigen. Bei sehr hohen externen P-Gehalten kommt es zur Akkumulation von internem P (sogenanntes „sur plus“). Ob die FTIR-Spektroskopie in der Lage ist auch diese hohen gespeicherten Nährstoffkonzentrationen zu messen muss noch untersucht werden.

Im Rahmen des Projektes konnten jedoch nicht allein die Nährstoffverhältnisse charakterisiert werden, sondern es zeigte sich zudem, dass FTIR-Spektren nach erfolgter Kalibration direkt für die Bestimmung des Wachstumspotentials verwendet werden können. Weitere Arbeiten werden zeigen in welchem Umfang dieses Wachstumspotential für die Gewässerüberwachung eingesetzt werden kann.

II.2. Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Personalkosten:

812: 70 Mann-Monate 141361,32 Euro

882: Beschäftigungsentgelte (studentische Hilfskräfte) 23539,44 Euro

Sachkosten:

IR-Modul für Einzelzellmessung (Resultec) 83.378,00 Euro

Zellzählgerät (Findeisen) 8.468,00 Euro

Schlauchpumpe (Mercateo) 1.790,95 Euro

Verbrauchsmaterial: 25.562,64 Euro

Aufträge an Kooperationspartner:

Fraunhofer IGB 44.940,00 Euro

Bundesanstalt für Gewässerforschung 26.414,00 Euro

II.3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die Einführung der FTIR Spektroskopie in biologische und gewässertechnologische Anwendungen war wissenschaftliches Neuland. Diese spektroskopische Technik hat in den letzten 10 Jahren eine außergewöhnliche technische Entwicklung erfahren, da die neue Gerätegeneration mit wesentlich weniger Probenmaterial auskommt und die heute dem Anwender zur Verfügung stehende Rechenleistung auch aufwendige mathematische Algorithmen zur Spektrenauswertung erlaubt. Während die Probenaufbereitung für reproduzierbare Spektren eine relativ leicht lösbare Aufgabe war, bestand die hauptsächliche Herausforderung darin, aus den komplexen Spektren die biologische bzw. anwendungstechnisch-relevante Information herauszufiltern. Dies konnte nur mit arbeitsaufwendigen Kalibrierungen erreicht werden. Der umfangreiche Arbeitsaufwand bestand hauptsächlich darin, Zellen mit definierten Wachstumseigenschaften und internen Nährstoffgehalten zu erzeugen und letztere mit möglichst hoher Genauigkeit mittels Elementaranalyse zu messen. Um die FTIR Analytik auch in Gewässern einsetzen zu können, war es notwendig, diese mit Elementaranalysen zu kalibrieren, die mittels DIN Methoden ermittelt wurden. Die DIN Methoden verlangen aber außerordentlich viel Probenmaterial. Ausreichendes Probenmaterial mit genau definierten Wachstumsraten ist aber nur über die aufwendigen Chemostatkulturen zu gewinnen.

Unabhängig davon waren auch die Kontrollmessungen an Einzelzellen notwendig, die vom Fraunhofer IGB in Stuttgart durchgeführt wurden. Diese Notwendigkeit ergibt sich aus der Tatsache, dass die Wachstumsraten und zellinternen Nährstoffgehalte der Zellen aus Chemostatkulturen nur einen Mittelwert über alle Zellen darstellen, und die einzelnen Zellen von diesem Mittelwert durchaus abweichen können. Da es dazu bisher noch keine Messmöglichkeit gab, war die Variabilität der Zellen in Chemostatkulturen unbekannt.

Entgegen der Erwartung erlaubte das neu konstruierte Gerät nicht die Messung von Einzelzellen. Das Gerät war so konstruiert worden, dass es zu einem angemessenen Preis in der Gewässergüteüberwachung auch eingesetzt werden kann und die neue Methode der FTIR Analytik an dem gleichen Probenmaterial durchgeführt werden kann wie die klassischen Utermöhl-Zählanalysen. Durch die Koppelung der IR-Spektroskopie mit der Durchflussanalytik konnte das Problem grundsätzlich als lösbar dargestellt werden. Dieser zusätzliche Aufwand beanspruchte jedoch mehr Zeit und konnte über eine kostenneutrale Verlängerung erfüllt werden.

Auch wenn aus den im Bericht dargelegten Gründen das Ziel nicht erreicht werden konnte, durch die IR Spektroskopie zellinterne Nährstoffmengen mit taxonomischer Auflösung zu bestimmen, um damit die Gewässergütemodelle robuster zu machen, lieferten die Freilandbeprobungen wichtige Informationen. Erstens zeigte sich, dass die Zellspektren aus Laborkulturen nicht so ohne weiteres auf Freilandalgen übertragbar sind. Zweitens wurde durch das Freilandmaterial auch klar, dass in den Gewässern auch Nährstoffsituationen auftreten, in denen die Zellen mit Phosphor überversorgt sind und damit die Wachstumsrate nicht durch die zellinternen Nährstoffstatus bestimmt sind. Diese

Erkenntnis hat zu neuen Ideen geführt, wie das in dem Vorhaben erzeugte Wissen, zukünftig für die Gewässerqualitätsüberwachung eingesetzt werden kann.

II.4. Voraussichtlicher Nutzen

II. 4.1. Anwendungen in der Biotechnologie

Die Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist, mit Hilfe der FTIR Spektroskopie nicht nur C:N, C:P oder C:Si Werte in Laborkulturen zu bestimmen, sondern auch das Verhältnis von Protein:Lipid:Kohlenhydrat quantitativ zu messen (Wagner et al. 2010). Angesichts der wachsenden Bedeutung der Algenbiotechnologie für die Gewinnung von Wertstoffen, insbesondere Lipiden (Hu et al., 2008, Brennan und Owende, 2010) oder die Gewinnung von Wasserstoff aus der Photofermentation, stellt die hier entwickelte Methode ein besonders wertvolles neues Messinstrument für die Prozessüberwachung dar. So kann das Wachstum der Kulturen durch spezifisch angewendete Nährstofflimitierung optimiert werden und somit die Bilanz einzelner Stoffwechselprodukte wie Kohlenhydraten oder Lipiden reguliert werden. In der Wasserstoffgewinnung wird zunächst der Kohlenstoff als Stärke gespeichert; in einer daran anschließenden anaeroben Dunkelphase wird die Stärke abgebaut und zu Wasserstoff und CO₂ umgesetzt (Ghirardi et al. 2000, Cantrell et al. 2008). Anhand der FTIR-Spektroskopie ist es inzwischen möglich, neben den Wachstumsparametern und den zellinternen Nährstoffgehalten auch den Stärkegehalt zu ermitteln (Wagner et al. 2010) und so das Wasserstoffsynthesepotential vorausgesagt werden. Da die täglich gebildete Stärkemenge in den Zellen aufgrund der Tageslichtschwankungen unterschiedlich sind, kann man in Kenntnis des Stärkegehalts die Länge der anaeroben Phase steuern und damit den Prozess optimal führen. Die Methode wurde daher schon von Forschungseinrichtungen, die mit der Wasserstofftechnologieentwicklung befasst sind, nachgefragt und wird von uns auch angeboten. (Prof. Posten, Karlsruhe; Prof. Kruse, Bielefeld).

Die FTIR Methode kann auch das Screening nach Algen mit besonders hohen Lipidgehalten unterstützen. Aufgrund der sehr geringen Probenmengen und der Möglichkeit, die Messungen auf Mikrotiterplatten durchzuführen, ist sie auch für den hohen Probendurchsatz und damit zum Screening geeignet.

II.4.2 Gewässermonitoring

Die hier entwickelte Methode hat ein großes Potential für einen Einsatz in der Gewässerüberwachung, da die Bestimmung der zellinternen Nährstoffverhältnisse die vorhandenen Modelle entscheidend verbessern kann. Das Entstehen von toxischen Algenblüten und die Phytoplanktonpopulationsdynamik können durch die gewonnenen Daten besser charakterisiert werden. Die Vorgehensweise zur Bestimmung der zellulären Elementarverhältnisse kann abschließend wie folgt zusammengefasst

werden. Nach der Probennahme in einem Freilandgewässer werden die einzelnen Großgruppen mittels Flowzytometer in Fraktionen aufgereinigt. Zu diesem Zeitpunkt kann eine mikroskopische Analyse der Fraktionen zeigen, ob und in welcher Zusammensetzung die Großgruppen sortiert werden konnten. Anschließend folgt ein Schritt zur Konzentration der Zellen, wobei sich eine Filtration als am besten geeignet herausgestellt hat. Die konzentrierte Zellsuspension kann nun mittels FTIR-Spektroskopie vermessen werden. Dabei sollte beachtet werden, dass für eine mikroskopische Analyse ausreichend Zellen vorhanden sind um ein gutes Signal zu Rauschverhältnis zu erhalten. Abschließend folgt dann eine Auswertung der gemessenen Spektren durch die Anwendung der im BMBF Projekt entwickelten PLS-Regressions Modelle zur Bestimmung der zellulären Elementarverhältnisse. Sollte eine zeitnahe Messung aufgrund der Entfernung des Probennahmeortes von dem Analyselabor nicht möglich sein, kann auf die Fixierung mit Lugolscher Lösung zurückgegriffen werden. Diese Proben sollten jedoch innerhalb weniger Tage vermessen werden, um die Fraktionierung in einzelne Großgruppen mittels Flowzytometer fehlerfrei zu gewährleisten.

II.5. Während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordene Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens.

Die beobachteten Streuungs-Artefakte bei der mikroskopgekoppelten FTIR-Spektroskopie wurden inzwischen intensiv untersucht (Bassan et al. 2009). Ein Algorithmus für die Korrektur dieser Mie-Streuung kann in Zukunft die Qualität der FTIR-Spektren potentiell erhöhen (Bassan et al. 2010).

Auch für die Gewässeranalyse mittels FTIR-Spektroskopie wurde inzwischen eine weitere Arbeit veröffentlicht. So zeigen Domenighini und Giordano (2009), dass anhand von FTIR-Spektren auf die Stickstoffquelle und den Ernährungszustand des Phytoplanktons zurückgeschlossen werden kann. Auch diese Autoren sehen ein großes Potential für die FTIR-Spektroskopie in der Gewässerüberwachung.

II.6. Die erfolgten und geplanten Veröffentlichungen der Ergebnisse

II.6.1 Vorträge auf nationalen und internationalen Tagungen

Wilhelm, C., Jungandreas A, Wagner H, From Photon to Biomass, new technologies to balance the energy from the input to the product. Hebrew University, 2009 (invited speaker)

Wilhelm, C., Jungandreas A, Wagner H. The fate of energy: from photon to product monitored by the help of FTIR spectroscopy. Beijing (2010) International Photosynthesis Congress

Wilhelm, C., Jungandreas A, Wagner H. Measurements of complete energy balances from photon to biomass: Principle and lessons. 8th Workshop of Biotechnology of Mikroalgae, Potsdam 2010

Wagner H (2007) Energy balance and biomass production in diatoms under N-limitation. 5. Mitteldeutsches Pflanzenphysiologie-Treffen Leipzig

Jebsen C, Wagner H, Wilhelm C (2008) Estimation the growth rate of algae under nutrient stress Mitteldeutsches Pflanzenphysiologie-Treffen Jena

Jebsen C, Wagner H, Wilhelm C (2008) Estimation the growth rate of algae under nutrient stress. Tagung der Sektion Phykologie der DBG, Wittenberg

Wagner H, Jebsen C, Jungandreas A, Liu Z, Wilhelm C (2009) FTIR spectroscopy as a new tool in algal biomass production. Botanikertagung "Plant for the Future" Leipzig

Wagner H, Jebsen C, Jungandreas A, Liu Z, Wilhelm C (2009) FTIR spectroscopy as a new tool in algal biomass production. FTIR Spectroscopy in Microbiological and Medical Diagnostics Robert Koch-Institute, Berlin

Jebsen C, Wagner H, Wilhelm C (2009) Measurement of internal phosphorus by Fourier Transform Infrared (FTIR) spectrometry to estimate the growth potential of phytoplankton. Mitteldeutsches Pflanzenphysiologie-Treffen, Halle

Jebsen C, Wagner H, Wilhelm C (2010) Schnelle Wachstumsanalyse mittels Infrarotspektroskopie. Tagung der Sektion Phykologie der DBG, Konstanz

Jungandreas A, Wagner H, Wilhelm C (2010) Applications of FTIR-Spectroscopy: Calibrating FTIR Spectra for Silica Analysis. Mitteldeutsches Pflanzenphysiologie-Treffen Dresden

II.6.2 Veröffentlichte Poster

Jebsen C, Wagner H, Wilhelm C (2009) Application of FT-IR spectroscopy for algal biomass production compared to fluorescence measurements. Botanikertagung "Plant for the Future" Leipzig

Jungandreas A, Wagner H, Wilhelm C (2009) FTIR-Spectroscopy as a tool to examine the silica-content in diatoms. Botanikertagung "Plant for the Future" Leipzig

Jebsen C, Wagner H, Wilhelm C (2009) Application of FT-IR spectroscopy for algal biomass production compared to fluorescence measurements. FTIR Spectroscopy in Microbiological and Medical Diagnostics Robert Koch-Institute, Berlin

II.6.3 Veröffentlichte und in Vorbereitung befindliche Publikationen

Wagner H, Liu Z, Langner U, Stehfest K, Wilhelm C (2010) The use of FTIR spectroscopy to assess quantitative changes in the biochemical composition of microalgae. (in press)

Jungandreas A, Wagner H, Wilhelm C (2010) The impact of silica limitation on two diatom species (in preparation)

Jebsen C, Norici A, Giordano M, Wilhelm C (2010) Growth prediction of *Microcystis aeruginosa* and *Protoceratium reticulatum* by FTIR spectroscopy and PLS regression models (in preparation)

Jebsen C, Wagner H, Wilhelm C (2010) Monitoring nutrient limitations in phytoplankton by the use of FTIR-spectroscopy (in preparation).

Liu Z, Dunker S, Wagner H, Wilhelm C (2010) IR-spectroscopy of natural phytoplankton samples sorted by fluorescence based flowcytometry (in preparation).

II.7. Literatur

- Bassan P, Byrne HJ, Bonnier F, Lee J, Dumas P, Gardner P (2009) Resonant Mie scattering in infrared spectroscopy of biological materials - understanding the 'dispersion artefact'. *Analyst* 134: 1586-1593
- Bassan P, Kohler A, Martens H, Lee J, Byrne HJ, Dumas P, Gazi E, Brown M, Clarke N, Gardner P (2010) Resonant Mie Scattering (RMieS) correction of infrared spectra from highly scattering biological samples. *The Analyst* 135: 268-277
- Brennan L, Owende P (2010) Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14:557-577
- Cantrel D, Ducey T, Ro K, Hunt P (2008) Livestock waste to bioenergy generation opportunities. *Bioresource Technology* 99:7941-7953
- Diem M, Boydston-White S, Chiriboga L (1999) Infrared spectroscopy of cells and tissues: Shining light onto a novel subject. *Applied Spectroscopy* 53:148-161
- Dodds WK, Straus EA, Lehmann R (1993) Nutrient dilution and removal bioassays to estimate phytoplankton response to nutrient control. *Archiv für Hydrobiologie* 128:467–481.
- Domenighini A, Giordano M (2009) Fourier transform infrared spectroscopy of microalgae as a novel tool for biodiversity studies, species identification and the assessment of water quality. *Journal of Phycology* 45:522-531
- Droop MR (1973) Some thoughts on nutrient limitation in algae. *Journal of Phycology* 9:264-272
- Falkowski PG (2000) Rationalizing elemental ratios in unicellular algae. *Journal of Phycology* 36:3-6
- Ghirardi M, Zhang L, Lee J, Flynn T, Seibert M, Greenbaum E (2000) Microalgae: a green source of renewable H₂. *Trends in Biotechnology* 18:506-511
- Giordano M, Kansiz M, Heraud P, Beardall J, Wood B, McNaughton D (2001) Fourier transform infrared spectroscopy as a novel tool to investigate changes in intracellular macromolecular pools in the marine microalga *Chaetoceros muellerii* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* 37:271-279
- Groot ML, Pawlowicz NP, van Wilderen LJGW, Breton J, van Stokkum IHM, van Grondelle R (2005) Initial electron donor and acceptor in isolated Photosystem II reaction centers identified with femtosecond mid-IR spectroscopy. *PNAS* 102:13087-13092.
- Hakanson L, Stenstrom-Khalili MI (2009) Uncertainties in Data and Spurious Correlations Related to the Redfield Ratio. *International Review of Hydrobiology* 94:338-351
- Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M (2008) Microalgal triacylglycerols as feedstock for biofuel production. *The Plant Journal* 54:621-639
- Monod J (1942) *Recherches sur la Croissance des Cultures Bacteriennes*. Herman, Paris

- Montages DJS, Berges JA, Harrison PJ, Taylor FJM (1994) Estimating carbon, nitrogen, protein and chlorophyll from volume in marine-phytoplankton. *Limnology and Oceanography* 39:1578-1578
- Patel SA, Currie F, Thakker N, Goodacre R (2008) Spatial metabolic fingerprinting using FT-IR spectroscopy: investigating abiotic stresses on *Micrasterias hardyi*. *Analyst* 133:1707-1713
- Pistorius AMA, DeGrip WJ, Egorova-Zachernyuk TA (2009) Monitoring of biomass composition from microbiological sources by means of FT-IR spectroscopy. *Biotechnology and Bioengineering* 103:123-129
- Sacksteder C, Barry BA (2001) Fourier transform infrared spectroscopy: A molecular approach to an organismal question. *Journal of Phycology* 37:197-199
- Sigee DC, Dean A, Levado E, Tobin MJ (2002) Fourier-transform infrared spectroscopy of *Pediastrum duplex*: characterization of a micro-population isolated from a eutrophic lake. *European Journal of Phycology* 37:19-26
- Stehfest K, Boese M, Kerns G, Piry A, Wilhelm C (2004) Fourier transform infrared spectroscopy as a new tool to determine rosmarinic acid in situ. *Journal of Plant Physiology* 161:151-156
- Stehfest K, Toepel J, Wilhelm C (2005) The application of micro-FTIR spectroscopy to analyze nutrient stress-related changes in biomass composition of phytoplankton algae. *Plant Physiology and Biochemistry* 43:717-726
- Toepel J, Wilhelm C, Meister A., Becker A, Martinez-Ballesta M. (2004) Cytometry of Fresh water phytoplankton. In: *Cytometry: New Developments (Methods in Cell Biology, 75)* Z. Darzynkiewicz (ed), pp. 375-407, ELSEVIER, San Diego
- Twining BS, Baines SB, Fisher NS, Landry MR (2004) Cellular iron contents of plankton during the Southern Ocean Iron Experiment (SOFEX). *Deep-Sea Research Part I-Oceanographic Research Papers* 51:1827-1850
- Utermöhl von H (1958) Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplanktonmethodik. *Mitt. Intern. Verh. Limnol.* 9, 1-39.
- Wagner H, Liu Z, Langner U, Stehfest K, Wilhelm C (2010) The use of FTIR spectroscopy to assess quantitative changes in the biochemical composition of microalgae. (in press)

III. Erfolgskontrollbericht

1. Beitrag der Ergebnisse zu den förderpolitischen Zielen

Es konnte erstmals eine Messeinrichtung aufgebaut und erprobt werden, die es erlaubt Phytoplanktonproben, die für die mikroskopische Analyse genommen worden sind, direkt einer IR-Analyse zugänglich zu machen. Es konnte gezeigt werden, dass die erhaltenen IR-Spektren grundsätzlich für die Gewässergüteanalyse einsetzbar sind. Es sind damit die Grundlagen für weitere Arbeiten gelegt, die dann zu dem Ziel führen können, die Gewässergütemodelle für stehende und auch für Fließgewässer zu verbessern, in dem entweder die zellinternen Nährstoffe, und zwar hier das C:N Verhältnis der verschiedenen Algentaxa in die Modellierung eingeht. Eine neue Perspektive ergibt sich daraus, dass man in Zukunft versuchen kann, aus den FTIR Spektren die aktuellen Wachstumsraten der Zellen zu bestimmen. Auf diese Weise könnte man für die Gewässerqualität besonders kritische Arten, wie z.B. toxin-bildende Cyanobakterien in ihrem aktuellen und prospektiven Gefahrenpotential einzuschätzen. Damit ist eine gute Grundlage dafür gelegt, die Vorgaben der Wasserrahmenrichtlinie, die die Berücksichtigung der Biodiversität verlangt, mit den biologischen Stoffumsätzen, die durch das Phytoplanktonwachstum bewerkstelligt werden, zu koppeln.

2. Wissenschaftliche Ergebnisse des Vorhabens, die erreichten Nebenergebnisse und die gesammelten wesentlichen Erfahrungen

Eines der wesentlichen Ergebnisse des Vorhabens ist der Nachweis, dass man die heute verfügbaren Geräte der FTIR Spektroskopie für die quantitative Analyse von Algenzellen einsetzen kann, die entweder aus dem Freiland oder aus Bioreaktoren stammen. Das hier vorgestellte Kalibrationsverfahren wird in Zukunft von Anwendern problemlos übernommen werden können. Insbesondere für die Algenbiotechnologie ergibt sich hierdurch ein wesentlicher Innovationsschritt, da man mit Hilfe der FTIR Spektroskopie im High-Throughput Zellen mit besonders hohem Lipid, Protein oder Kohlenhydratgehalt screenen kann. Neu ist auch, dass man das FTIR Spektrum als einen Fingerprint für das Wachstum und damit für die Prozesskontrolle einsetzen kann. Das im J. Biophotonics veröffentlichte Messverfahren wird sicherlich im Bereich der Biotechnologie weite Verbreitung finden. Wir sind von Anwendern in dieser Sache schon kontaktiert worden. Wesentlich ist jedoch auch die Erfahrung, dass Freilandmaterial nicht direkt mittels FTIR Spektroskopie vermessen kann, sondern an eine vorherige Reinigung über eine Zellsortierung gebunden ist.

3. Fortschreibung des Verwertungsplans

Aus dem Vorhaben sind keine Erkenntnisse entstanden, die zu einer Patent- oder Schutzanmeldung führen werden. Die hier entwickelte FTIR Methode wird die sich gerade in Deutschland stark entwickelnde Algenbiotechnologie stark unterstützen. So werden schneller neue Arten identifiziert werden können, die sich hinsichtlich ihrer Zellinhaltsstoffe, insbesondere bei Lipiden, besser für die Algenmassenkultur eignen. Auch im Bereich der Prozesskontrolle, z.B. bei der richtigen Wahl des Umschaltzeitpunktes auf Anaerobiose bei der Wasserstoffproduktion wird die hier entwickelte Methode Vorteile bringen. Hier planen wir ein Wasserstoffoptimierungsprotokoll basierend auf FTIR Spektren. Dies wird vor allem im Rahmen von Konsortien geschehen, die auf dem Gebiet der Bioenergie aktiv sind. Die Ausarbeitung eines Protokolls, das die Wachstumsprognose von Phytoplankton auf der Grundlage von FTIR Spektren erlaubt, wird mit Projektpartnern aus der Wasserwirtschaft fortgesetzt.

4. Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben

Leider konnte das ursprüngliche Ziel, die aus den Laborkulturen gewonnen Auswertemodelle direkt auf Freilandalgen zu übertragen, nicht erreicht werden. Die Ursachen dafür wurden im Bericht erläutert. Auch die Messung des C/P Verhältnisses lässt sich nicht in einem auf alle Algenzellen anwendbaren Modell durchführen, während dies beim C:N Verhältnis möglich ist.

5. Präsentationsmöglichkeiten

Die hier entwickelte Methode wird auf Tagungen und Konferenzen für Biospektroskopie und für Mikrobielle Biotechnologie vorgestellt werden. Wie schon im Bericht dargelegt, ist die Nachfrage nach Vorträgen und Präsentationen ausgesprochen hoch.

6. Einhaltung der Ausgaben und Zeitplanung

Der Kosten- und Zeitplan wurde weitgehend eingehalten. Aufgrund der Probleme bei der Vermessung des Freilandplanktons, musste der Arbeitsplan um die Vorreinigung mittels Durchflusszytometrie ergänzt werden. Das war anfangs nicht vorgesehen und hat mehr Zeit in Anspruch genommen und konnte durch eine kostenneutrale Verlängerung des Vorhabens um sechs Monate gelöst werden.