



DGG-Proceedings

Vol. 1, 2011

Short Communications - Annual Conference DGG and BHGL
23.02. - 26.02.2011, Hannover, Germany
Peer Reviewed

Editorial Board and Review

Balder, Hartmut *Berlin*
Damerow, Lutz *Bonn*
Dirksmeyer, Walter *Braunschweig*
Drüge, Uwe *Erfurt*
Michaelis, Gerlinde *Bad-Zwischenahn*
Rath, Thomas *Hannover*
Schreiner, Monika *Großbeeren*
Schuster, Mirko *Dresden*
Winkelmann, Traud *Hannover*

German Society of Horticultural Sciences (DGG)
Herrenhäuser Str. 2
30419 Hannover
Germany

© DGG, 2011

DGG-Proceedings, Vol. 1, No. 11, p. 1-5. DOI: 10.5288/dgg-pr-01-11-sz-2011

Serge Zagermann*, Sebastian Menke, Bernhard Huchzermeyer, Thomas Rath

Entwicklung einer Methodik zur nicht-invasiven Online-Bestimmung spektraler
Charakteristika von Mikroalgen

*Corresponding Author:

Serge Zagermann

Leibniz Universität Hannover
Institut für Biologische Produktionssysteme
Fachgebiet Biosystem- und Gartenbautechnik
Herrenhäuser Straße 2,
30419 Hannover
Germany
Email: zagermann@bgt.uni-hannover.de

Entwicklung einer Methodik zur nicht-invasiven Online-Bestimmung spektraler Charakteristika von Mikroalgen

Serge Zagermann¹, Sebastian Menke¹, Bernhard Huchzermeyer², Thomas Rath¹

Leibniz Universität Hannover, ¹Institut für Biologische Produktionssysteme, FG Biosystem- und Gartenbautechnik, ²Institut für Botanik, Herrenhäuser Str. 2, D-30419 Hannover

1. Einleitung, Stand des Wissens, Zielsetzung

Mikroalgen bieten aufgrund ihrer Vielfalt sowie der Möglichkeit zur sterilen Anzucht in Photobioreaktoren (PBR) die Möglichkeit zur zielgerichteten Wirkstoffproduktion für verschiedenste Industriezweige. Die Vorteile von PBR-Kulturen liegen dabei in der Definierbarkeit der vorherrschenden Anzuchtbedingungen und dem Schutz vor Kontaminationen durch andere Mikroorganismen. Einen Überblick über die meistverbreiteten Reaktortypen gibt Posten (2009). Um eine zielgerichtete Kulturführung zu ermöglichen, ist neben der Überwachung von Prozessparametern das Verhalten der kultivierten Organismen an sich zu verfolgen, wobei in sterilen Prozessen nicht-invasive Messverfahren solchen, die durch Probennahmen die Kulturführung stören, vorzuziehen sind. Häufig werden spektroskopische Analysen durchgeführt, wobei im besten Fall anhand von Spektralanalysen auf die Zusammensetzung und den Zustand von Mikroorganismenpopulationen und ihrer Individuen geschlossen werden kann (Domenighini & Giordano, 2009).

Im Bereich der spektrometrischen Analysen von Algen und Algenpopulationen gibt es verschiedene Ansätze. Diese umfassen Messungen im sichtbaren (VIS) oder infraroten (IR) Spektralbereich (Maske & Haardt, 1987, Domenighini et al., 2009), Absorptions- oder Reflexionsmessungen (Millie et al., 1997, Hunter et al., 2008) und Hyperspektralanalysen (Thieman & Kaufmann, 2002). Vor allem in der Gewässer-Fernerkundung sind VIS- und NIR-Techniken verbreitet (Tong et al., 2010). Automatisierte Extinktionsmessungen in Bioreaktoren sind dabei mittels inserierter Sonden möglich oder durch Messungen an der Reaktoraußenseite realisierbar (Eriksen & Iversen, 1995). Bisherige Verfahren fokussieren dabei im wesentlichen auf die Erkennung und Überwachung von Kulturdichten und nicht auf die *In-vivo*-Analyse ganzer Spektralsignaturen. Ziel dieser Arbeit war es daher, einen airlift-Mattenphotobioreaktor mit einem System auszurüsten, welches es erlaubt, Kulturen von Mikroalgen im laufenden Reaktorbetrieb im sichtbaren Spektralbereich spektrometrisch zu untersuchen, zu unterscheiden und zu interpretieren.

2. Material und Methoden

Als Versuchsorganismen dienten *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina*, *Nannochloropsis salina* sowie *Tetraselmis marina*, welche von der Sammlung für Algenkulturen in Göttingen (SAG) bezogen wurden. *Chlorella* wurde in einer Lösung aus destilliertem Wasser mit 2 % v/v Grünpflanzenmehrnährstoffdünger angezogen. Alle übrigen Organismen wurden in

Seawater-Medium kultiviert. Vor ihrer Verwendung wurden alle Medien autoklaviert. *Dunaliella* wurde mit einer OD_{850} von 0,2 inokuliert, alle anderen Algen mit einer OD_{850} von 0,3. Es wurden jeweils 50 ml in fünf biologischen Replikaten für 60 Tage im Batch-Verfahren kultiviert. Als Anzuchtssysteme dienten airlift-Mattenreaktoren (Menke *et al.*, 2011). Die Matten wurden bei 25 °C temperiert und mit Raumluft begast. An einem Reaktor wurden Osram-Leuchtstoffröhren des Typs Lumilux 865 verbaut, am zweiten Luxeon Rebel Leuchtdioden der Firma Philips. Die Beleuchtung geschah jeweils mit einer Lichtintensität von $12 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Die Aufnahme der Extinktionsspektren geschah jeden zweiten Versuchstag mit einem USB4000-Spektrometers der Firma Ocean Optics, die verwendeten Lichtleiter besaßen einen Innendurchmesser von 400 μm . Zur Aufnahme der Spektren wurde die Software Spectra Suite (Ocean Optics) verwendet, bei einer Integrationszeit von 100 Millisekunden sowie 25 Abtastungen je Probe, welche gemittelt und als Einzelspektrum ausgegeben wurden. Für die nachfolgenden Analysen wurden die Spektralbereiche von 400 bis 800 nm verwendet. Alle nachfolgend beschriebenen Operationen wurden mit dem Programm 'The Unscrambler' (CAMO Software Inc.) in der Version 10.0.1 durchgeführt. Die Rohspektren wurden per gleitenden Mittelwert bei einer Filterbreite von 25 Umgebungswerten geglättet und flächennormiert. Zur weitergehenden Klassifizierung der Proben wurden Hauptkomponentenanalysen (PCA) mit zwei berechneten Hauptkomponenten durchgeführt. Dazu wurde ein NIPALS (Non-linear iterative partial least squares) Algorithmus verwendet.

3. Ergebnisse

Es wurde ein Spektralanalysesystem entwickelt, welches die Aufnahme von Spektralsignaturen von Algensuspensionen an der Außenseite eines Photobioreaktors ermöglichte. Die Messungen erfolgten dabei indem Kulturmatten in den Lichtweg zwischen Lichtquelle und Detektor eingespannt wurden (Siehe Abb. 1).



Abb. 1: Messkopf mit eingespannter Kulturmatten. Links: Frontansicht. Mitte: Aufsicht des Messkopfes ohne Matte. Rechts: Detailansicht mit eingespannter Anzuchtmatte

Die Fixierung der verwendeten Lichtleiter wurde derart konzipiert, dass eine Veränderung der Wegstrecke zwischen beiden Enden eine Messung über einen weiten Bereich von Kulturdichten ermöglichte. Beste Ergebnisse wurden erzielt, wenn während den Messungen sowohl die Reaktorbegasung als auch die Beleuchtung reduziert bzw. abgeschaltet wurde. Für die durchgeführten PCAs wurden die Spektren aller Proben der Messtage 0, 16, 30 sowie 60 weitergehend ausgewertet. In Abbildung 2 sind beispielhafte Aufnahmen von Proben und ihrer zugehörigen online-Spektren dargestellt. Es wird deutlich, dass differenzierende Spektralaufnahmen auch im laufenden Reaktorbetrieb ohne Probenentnahme möglich sind, wobei die für photosynthetisch aktive Organismen charakteristischen Extinktionspeaks detektiert werden, deren Intensität und Lage aber

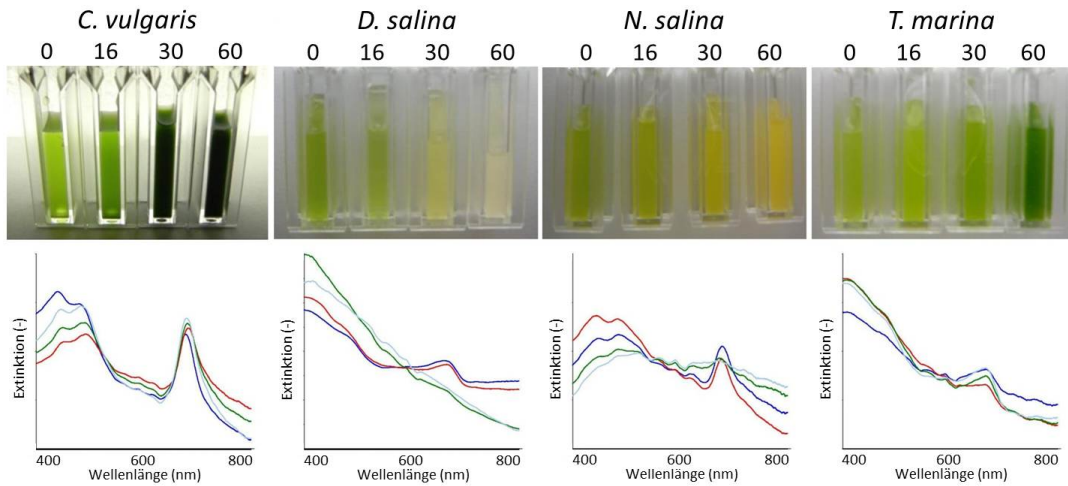


Abb. 2: Spektrometrisch vermessene Proben verschiedener Mikroalgen und zugehörige Extinktionsspektren. Gezeigt sind Tag 0 (dunkelblau), 16 (rot), 30 (grün) sowie 60 (hellblau)

maßgeblich vom Versuchsorganismus abhängig ist. Ferner sind deutliche Veränderungen der spektralen Signaturen im Kulturverlauf zu beobachten. Um eine weitergehende Auswertung der Extinktionsspektren zu realisieren, wurden die aufgenommenen Spektren im Hinblick auf die Unterscheidung von Entwicklungsstadien analysiert. Abbildung 4 stellt die Daten von vier Messtagen (0, 16, 30 sowie 60; *Tetraselmis* 0, 16, 30) exemplarisch dar.

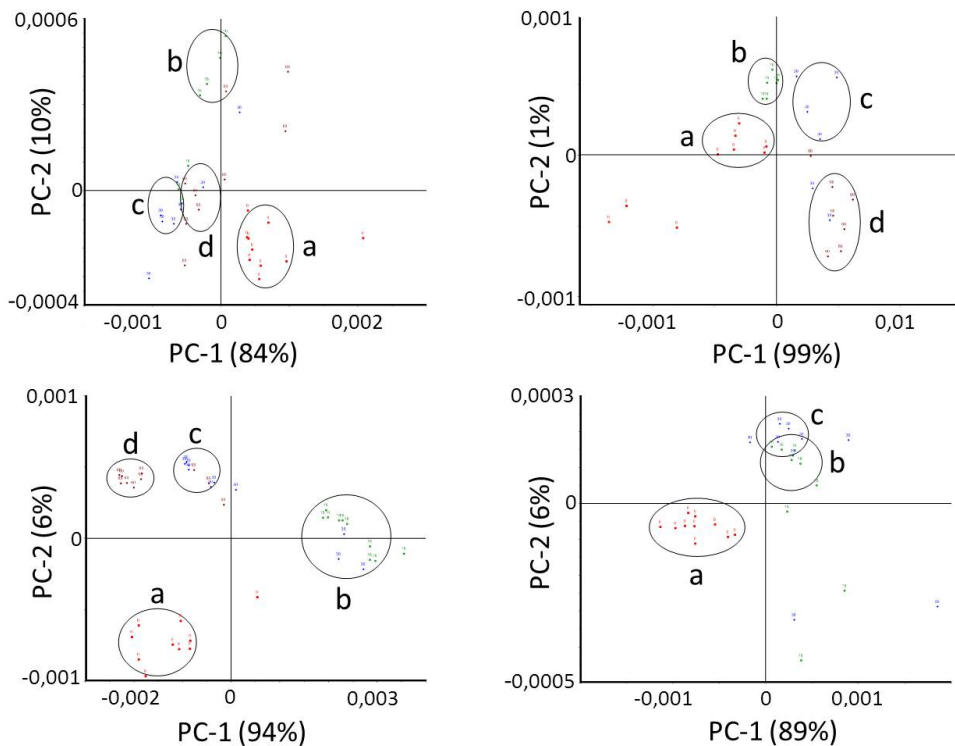


Abb. 4: Score-Plot der durchgeführten PCA. Oben: *Chlorella*, *Dunaliella*; unten: *Nannochloropsis*, *Tetraselmis* (jeweils v.l.n.r) a: Tag 0, b: Tag 16, c: Tag 30, d: Tag 60

Es wird deutlich, dass nur bei den Algen eine Differenzierung erfolgen kann, bei denen durch verschiedene Wachstumsphasen Farbdifferenzen auftreten (siehe auch Abb. 2).

4. Diskussion

Es konnte ein Messsystem entwickelt werden, welches den in der Zielsetzung definierten Anforderungen entsprach. Der entwickelte Messkopf machte eine Positionierung der Lichtleiter an den Anzuchtmatten verlässlich möglich. Das System war dabei stabil genug, um auch nach mehrmaligem Gebrauch reproduzierbare Messergebnisse zu liefern. Ein voll automatisierter Betrieb des beschriebenen Photobioreaktors in Screeningversuchen erscheint damit realisierbar.

In allen Fällen konnten bei vitalen Algen die Algenspezies in Reinkultur mit Hilfe des online-Systems differenziert und klassifiziert werden. Da es sich bei allen verwendeten Organismen um Grünalgen handelte, ist die gute Unterscheidbarkeit der Algenspezies vor allem auf Unterschiede im Carotinoidgehalt der Algen zurückzuführen. Neben ubiquitären Chlorophyll-*a*-Peaks bei 680 und 440 nm, war bei allen Arten ein weiterer, mehr oder minder ausgeprägter Peak bei 480 nm erkennbar, welcher durch Chlorophyll *b* hervorgerufen wurde (siehe auch Rowan, 1989). Der letztgenannte Peak wurde in einigen Proben durch primäre Carotinoide maskiert, welche in den Thylakoidmembranen lokalisiert sind und strukturelle und funktionelle Komponenten des Photosyntheseapparates sind (Jin et al., 2003). Im folgenden Kulturverlauf war vor allem bei *Dunaliella* und *Nannochloropsis* eine erhöhte Extinktion im kurzwelligen Spektralbereich bis 500 nm zu beobachten. Diese wurde zum einen durch sekundäre Carotinoide (z.B. Xanthophylle) hervorgerufen, welche von verschiedenen Algen als Stressreaktion, zum Beispiel als Antwort auf Lichtstress oder Nährstoffknappheit gebildet werden (Jin et al., 2006). Zusätzlich kam es bei diesen beiden Organismen im Kulturverlauf zu einer verstärkten Dechlorophyllierung der Zellen, wodurch lediglich im kurzwelligen Spektralbereich Absorption durch Carotinoide stattfand. Zudem dürften aufgrund von Nährstoffmangel viele Zellen in den *Dunaliella* Proben lysiert sein, wodurch sich vermehrt Zelltrümmer im Anzuchtmedium anreicherten. Der zum kurzwelligen Spektralbereich ansteigende Kurvenverlauf der Extinktionskurven ist durch Algenbruchstücke und Detritus (Maske & Haardt, 1987) sowie depigmentierte Zellen (Latimer & Rabinovitch 1959) erklärbar.

Die unterschiedlichen Zellmorphologien und Pigmentzusammensetzungen waren ausschlaggebend für die erfolgreiche Unterscheidung der verschiedenen Algenarten mittels der durchgeführten Hauptkomponentenanalysen. Erschwert wurden alle Einteilungen durch aberrante Spektren, welche auf unterschiedliche Wachstumsstadien zurückzuführen waren, die wahrscheinlich aufgrund leicht unterschiedlicher Begasungsraten einzelner Wiederholungen entstanden. Da sich die Extinktionsspektren von *Chlorella* und *Tetraselmis* nur minimal im Kulturverlauf veränderten, entsprach die schlechte spektroskopische Unterscheidbarkeit ihrer Wachstumsstadien den Erwartungen. Die relativ klaren Gruppierungen von *Dunaliella* und *Nannochloropsis* sind auf starke Veränderungen der Pigmentzusammensetzungen im Kulturverlauf zurückzuführen. Neben der erwähnten Dechlorophyllierung, welche eine teilweise Unterscheidbarkeit entlang der zweiten Hauptkomponente ermöglichte, sorgten hierbei vor allem die Veränderungen in den Carotinoidgehalten für klare Unterscheidungen entlang der ersten Hauptkomponente. Insgesamt zeigte sich, dass ähnliche Spektren voneinander unterschieden werden

können, sofern diese zumindest über gewisse charakteristische Extinktionsmerkmale verfügen. Ein PCA-Modell mit zwei Hauptkomponenten erschien hierbei ausreichend.

5. Schlussfolgerung

Das entwickelte Spektralmesssystem ermöglicht die reproduzierbare Aufnahme von Extinktionsspektren von Algenkulturen im laufenden Reaktorbetrieb und bewies dabei seine Praxistauglichkeit und Robustheit. Eine Datenverdichtung mittels Hauptkomponentenanalysen war erfolgreich und vereinfachte nachfolgende Klassifizierungen der vermessenen Proben. Die Einhaltung von konstanten Rahmenbedingungen (Licht, Begasung, etc.) sowie die Veränderung oder Stabilität von Zellpigmentierungen im Wachstumsverlauf beeinflussen jedoch die Erfassung und Interpretation der Spektraldaten wesentlich.

6. Literatur

- 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
- Eriksen, N. T., Iversen, J. J. L. (1995) On-line determination of pigment composition and biomass in cultures of microalgae. *Biotechnology Techniques* 9 (1): 49-54
- Hunter, P. D., Tyler, A. N., Présing, M., Kovács, A. W., Preston, T. (2008) Spectral discrimination of phytoplankton colour groups: The effect of suspended particulate matter and sensor spectral resolution. *Remote Sensing of Environment* 112: 1527-1544
- Jin, E., Polle, J. E. W., Lee, H. K., Chang, M. (2003) Xanthophylls in microalgae: From biosynthesis to biotechnological mass production and application. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 13 (2): 165-174
- Jin, E., Lee, C.-G., Polle, J. W. (2006) Secondary carotenoid accumulation in *Haematococcus* (Chlorophyceae): Biosynthesis, regulation, and biotechnology. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 16 (6): 821-831
- Latimer, P., Rabinowitch, E. (1959) Selective scattering of light by pigments in vivo. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 84: 428-441
- Maske, H., Haardt, H. (1987) Quantitative in vivo absorption spectra of phytoplankton: Detrital absorption and comparison with fluorescence excitation spectra. *Limnology and Oceanography* 32 (3): 620-633
- Menke, S., Huchzermeyer, B. und Rath, T. 2011: Photobioreaktoren für das Screening von Mikroalgen. *Biologie in unserer Zeit (BIUZ)*, 2011, in Druck.
- Millie, D. F., Schofield, O. M., Kirkpatrick, G. J., Johnsen, G., Tester, P. A., Vinyard, B. T. (1997) Detection of harmful algal blooms using photopigments and absorption signatures: A case study of the Florida red tide dinoflagellate, *Gymnodinium breve*. *Limnology and Oceanography* 42 (5): 1240-1251
- Posten, C. (2009) Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Engineering in Life Sciences* 9 (3): 165-177
- Rowan, K. S. (1989) *Photosynthetic pigments of microalgae*. Verlag Cambridge University Press, Cambridge
- Thiemann, S., Kaufmann, H. (2002) Lake water quality monitoring using hyperspectral airborne data - a semiempirical multisensor and multitemporal approach for the Mecklenburg Lake District, Germany. *Remote Sensing of Environment* 81: 228-237