



Forschungsbericht 2009  
Projekt ALSENS  
Prof. Dr. Martin Loeffler-Mang  
Dr. Anneliese Ernst

## **ALSENS**

# **Entwicklung eines Sensors zur Unterscheidung von Mikroalgen in Mischkulturen**

### **Inhaltsverzeichnis**

1. Zusammenfassung
2. Ausgangspunkt und Ziele des Projekts
3. Streulichtmessungen an Microbeads und Mikroalgen
4. Untersuchungen an wachsenden Kulturen
5. Kritische Betrachtung der Ergebnisse
6. Ausblick
7. Literaturverzeichnis

### **1. Zusammenfassung**

Im Projekt ALSENS wurde untersucht, ob Streulicht-Sensoren geeignet sind, um das Wachstum und die Zusammensetzung von Mikroalgen in Photobioreaktoren zu analysieren. Zur Realisierung des Projekts wurden Streulicht-Untersuchungen an definierten Polystyrol-Kügelchen (Microbeads) und an Mikroalgen mit deutlichen Formunterschieden durchgeführt. Außerdem wurde ein Transmissions-Sensor eingesetzt, um das Tageslicht-abhängige Wachstum verschiedener Mikroalgen kontinuierlich aufzuzeichnen.

Die Untersuchungen zeigten, dass statische (= nicht wachsende) Mikroalgen eine ähnliche, von Winkel und Partikelzahl abhängige, Streulichtcharakteristik haben wie Microbeads. In wachsenden Algenkulturen wurde die Zunahme der Zellzahl jedoch von periodischen Veränderungen in der optischen Dichte und Lichtstreuung überlagert. Verschiedene Algen zeigten dabei sehr unterschiedliche Tagesgänge. Die mit der Tageszeit korrelierten Änderungen der optischen Dichte legen nahe, dass Prozesse, die durch den Licht/Dunkel-Wechsel synchronisiert werden, wie Zellteilung und die Bildung von Speicherstoffen, einen stärkeren Einfluss auf die Lichtstreuung haben, als Formunterschiede. Eine Sensorentwicklung, die nur Formunterschiede berücksichtigt, erscheint deshalb nicht zielführend.

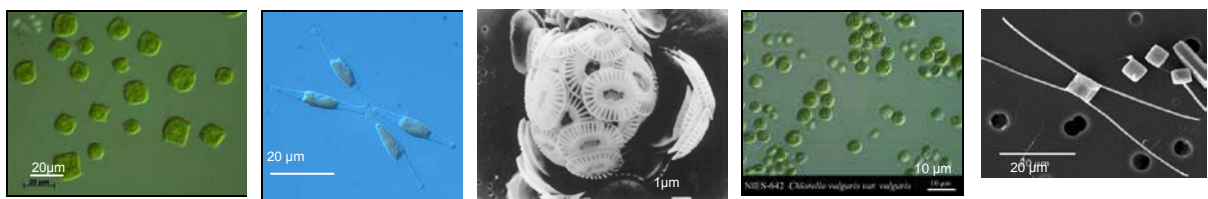
## 2. Ausgangspunkt und Ziele des Projekts

Optische Sensoren wandeln optische Informationen direkt in elektrische Signale um. Auf diese Weise lässt sich relativ einfach und kostengünstig eine berührungslose, kontinuierliche Überwachung von Vorgängen und Prozessen realisieren. Der Einsatzbereich geht von einfachen Erkennungsaufgaben (z. B. Lichtschranke), über Drehzahl- und Winkelmessung (Inkrementalgeber) bis zu Abstandsmessung in Industrie und Technik. In der Biotechnologie misst man mit optischen Sensoren die Konzentration von gelösten, gefärbten Stoffen und Trübungen, die von der Lichtstreuung an Partikel verursacht wird. Letzteres kommt zum Beispiel in der Qualitätskontrolle von Trinkwasser und bei der Bestimmung des Trockensubstanzanteils in der Fermentations- und Abwassertechnologie zum Einsatz.

Mikroskopisch kleine Partikel streuen Licht, d.h. sie lenken es von seiner ursprünglichen Richtung ab. Die Lichtstreuung wird nicht nur von der Konzentration der Partikel, sondern auch von deren geometrischen Form und Materialeigenschaften beeinflusst. Diese zusätzlichen Wechselwirkungen nutzten wir in früheren Projekten für die Entwicklung von kostengünstigen Streulichtsensoren, die nicht nur Trübungen (Sichtbehinderung) messen, sondern auch die Partikelart erkennen, die diese Trübung verursacht. Ein mögliches Anwendungsgebiet für diese Sensorik ist die Biomassegewinnung mittels Mikroalgen, die als aussichtreichste Technologie für einen zukünftigen Ersatz von fossilen Treibstoffen gilt (Christi, 2008, Brennan und Owende 2010).

Mikroalgen sind photosynthetische Organismen, die das Licht der Sonne absorbieren und, wie Pflanzen, die Lichtenergie nutzen, um aus Wasser, CO<sub>2</sub> und mineralischen Nährstoffen Biomasse aufzubauen. Da sie das sichtbare Licht absorbieren, ist ein Einsatz von optischen Verfahren im Bereich des sichtbaren Lichts nur begrenzt möglich. Wasser und Biomoleküle absorbieren dagegen kaum das nahe Infrarotlicht (NIR, Babin und Stramski, 2002). In diesem Bereich beruht die Extinktion (Abschwächung) des Lichts überwiegend auf Streuung. Sandnes et al.(2006) nutzte diesen Energiebereich, um die Zunahme der Biomasse von Mikroalgen über die Abnahme der Transmission zu bestimmen. Dieses Verfahren wurde im Projekt ALSSENS aufgegriffen.

Abbildung 1



*Brachiomonas\**

*Phaeodactylum\**

*Emilia\** (SEM)

*Chlorella\**

*Chaetoceros* (SEM)

\* in dieser Untersuchung

Mikroalgen zeichnen sich durch eine große Formenvielfalt aus (Abb. 1). Bei der Zellzählung mit Flow-Cytometer wird dies genutzt, um einzelner Zellen beim Queren eines Laserstrahls zu unterscheiden, indem man gleichzeitig die Fluoreszenz- und Streulichtcharakteristik registriert (Price et al., 1978; Wyatt & Jackson, 1989). Mit geeigneter Zusatzausrüstung können Mikroalgen auf diese Weise sogar für weitere Untersuchungen sortiert werden. Die Analyse einzelner Zellen ist jedoch zu aufwändig und zu teuer für eine automatisierte Überwachung des Wachstums von Mikroalgen in Bioreaktoren. Im Projekt ALSSENS untersuchten wir, ob man kostengünstige Streulichtsensoren entwickeln kann, die Algen anhand ihrer Zellgeometrie unterscheiden können.

### 3. Streulichtmessungen an Microbeads und Mikroalgen

Für die Messung der Lichtstreuung durch kleine Partikel wurde ein Streulichtklinometer auf einer optischen Schiene aufgebaut (Abb. 2). Das Set-up bestand aus einem Laser (780 nm, max. 3 mW), Detektor und Transimpedanzverstärker von Keyence (Modell LX2-11WT), einem Vielfachmessgerät (Agilent 34401A) und eine PC zur Datenerfassung. Zwischen Emitter und Detektor befand sich ein Becherglas (Innen-Ø 47.5mm) oder eine Rundkuvette (Innen-Ø 40.5 mm), in welchem die Partikel in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt wurden. Die in Wasser/Meerwasser resuspendierten Microbeads/marine Mikroalgen wurden regelmäßig mit einer Pipette gemischt, um zu verhindern, dass sie sedimentieren. Das von den Partikel gestreute Licht wurde in 5°-Schritten in einen Winkelbereich von 295° (Mikroalgen) bzw. 320° (Microbeads) um die Kuvette herum gemessen, wobei die Einstrahlrichtung dem Winkel 0° entsprach. Die Messwerte wurden mit Hilfe eines LabVIEW-Programms als Mittelwerte von jeweils 50 Messwerten gespeichert.

**Abbildung 2**

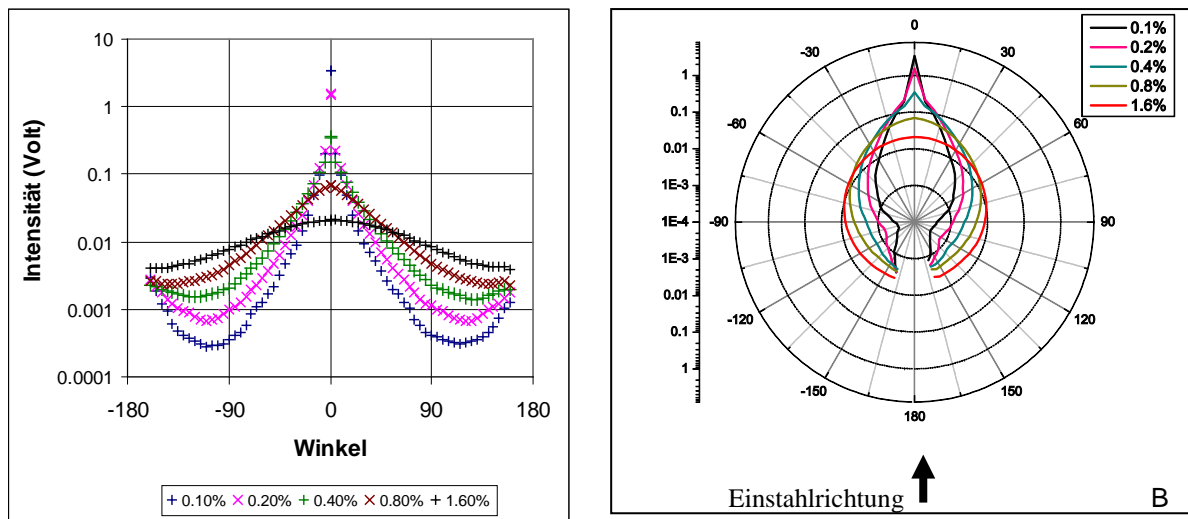
*Streulichtklinometer für die Messung des von Partikel verursachten Streulichts mit einer Lichtschranke von Keyence.*



Wir untersuchten den Einfluss von Konzentration und Partikeldurchmesser auf die Lichtstreuung and Microbeads, die in definierten Größen geliefert werden (Calibre® Firma Microbeads, Norwegen). Die Microbeads wurden schrittweise verdünnt, bis sie eine mit den Suspensionen der Mikroalgen vergleichbare Transmission des Lichts aufwiesen. Die eingesetzten Konzentrationen entsprechen 4 Verdoppelungen der Anzahl der Kügelchen (4 Generation bei wachsenden Mikroalgen (Abb. 3).

Nicht unerwartet stellten wir fest, dass mit zunehmender Konzentration der Microbeads die Transmission ab- und das Streulicht zu nimmt (Abb. 3). Die aus der Konzentrationsabhängigkeit näherungsweise bestimmten Extinktionskoeffizienten und aus der Steigung der Streulichtfunktion abgeleiteten Streulichtkoeffizienten (bei 90°) nehmen mit annähernd 1/x des Durchmessers der Microbeads ab (Abb. 4 A und B). Die Abweichung von einem 1/x-Zusammenhang wurde mit Hilfe der Herstellerangaben zu Konzentration, Dichte und mittlerem Durchmesser der Microbeads auf Unterschiede in der Konzentration der gelieferten Suspensionen zurückgeführt (Abb. 4C). Die Ergebnisse zeigen, dass Extinktions- und Streulichtkoeffizienten von der Beschattungsfläche bestimmt werden. Wie erwartet, folgt bei gleicher Massenkonzentration die Beschattungsfläche dem Durchmesser in einer 1/x Funktion.

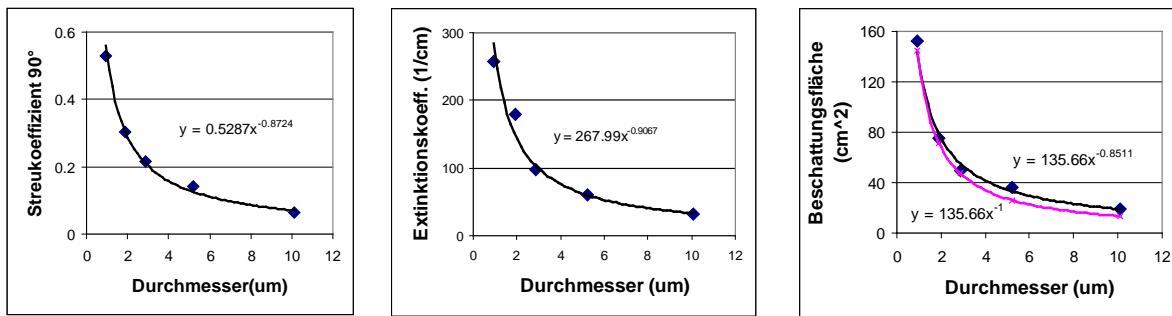
Abbildung 3



A: Intensität des Streulichts von Microbeads mit einem Durchmesser von 1,9  $\mu\text{m}$  (Calibre, Microbeads, Norwegen)  
 Konzentration: 0,01g/ml; Dichte: 1,05 g/ml;  
 Refraktionsindex: 1,59 (589 nm, 25°C).

B Darstellung der Daten von Abb. A in Polarkoordinaten.

Abbildung 4



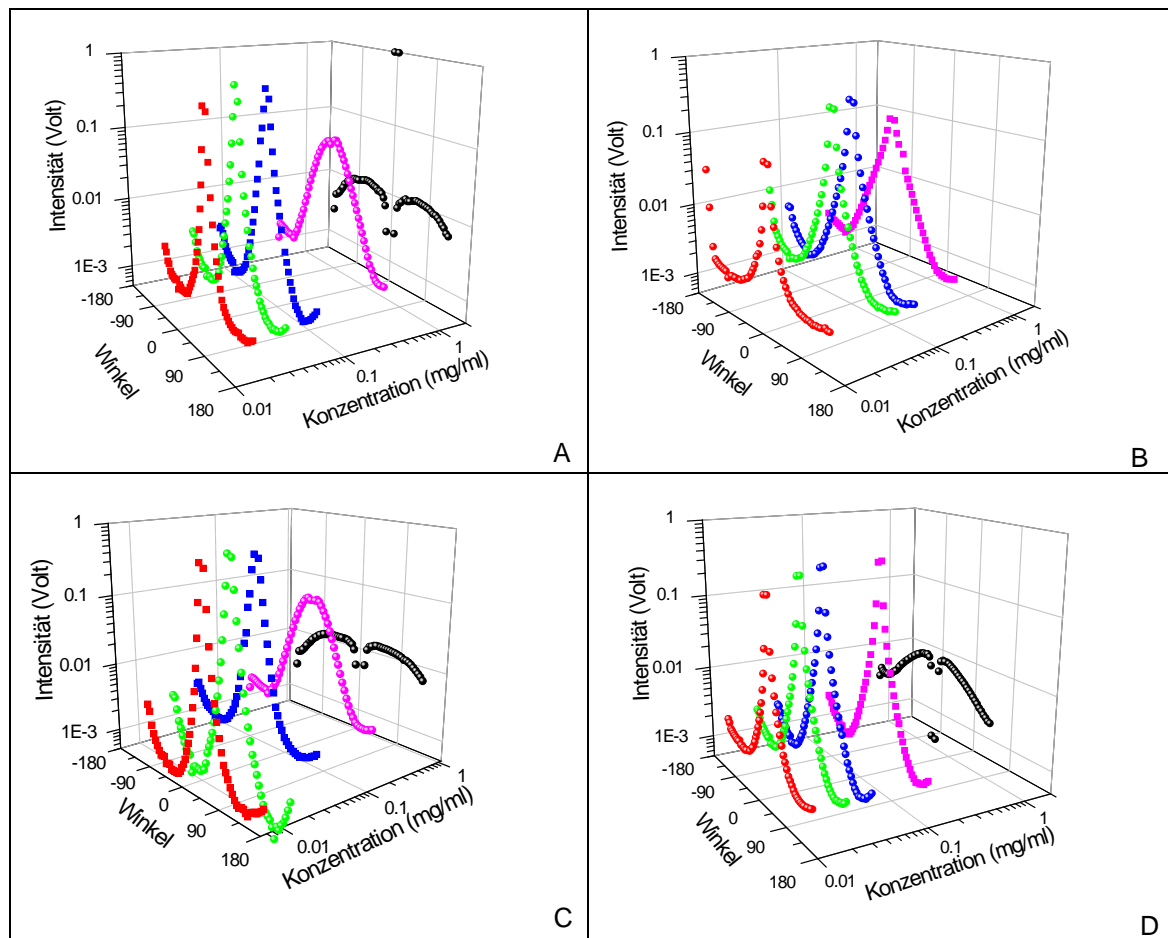
A: Abhängigkeit der Steigung der Streulichtfunktion vom Partikeldurchmesser mit Trendlinie.

B: Abhängigkeit des Extinktionskoeffizienten vom Partikeldurchmesser mit Trendlinie.

C: Beschattungsfläche der Microbeads, berechnet aus den Herstellerangaben zu Konzentration, Dichte und Partikeldurchmesser (Trendlinie schwarz); für eine einheitliche Konzentration von 0,01 g/ml ergäbe sich Trendlinie 2 (pink).

Um einen Einfluss der Zellgeometrie auf die Lichtstreuung zu erkennen, untersuchten wir Mikroalgen mit sehr unterschiedlichen Zellwandstrukturen: die spindelförmige Kieselalge *Phaeodactylum tricornutum*, deren Form durch glasartige Zellwände (Frusteln) bestimmt wird, die kugelförmige, aber mit Plättchen aus Calciumkarbonat überzogenen Coccolithophoride *Emiliana* sp. und die beiden Grünalgen *Chlorella autotrophica* und *Brachiomonas* sp., die eine organische Zellwand haben (vgl. Abb. 1). Die Mikroalgen wurden vor der Messung im Kühlschrank aufbewahrt. Dadurch befanden sie sich in einem physiologischen Ruhezustand, in dem sie in der Natur Winterperioden überdauern. In diesem Zustand bleiben die Zellstrukturen (Zellwände, Organellen, Pigmente) über lange Zeit erhalten, aber die Kohlenhydratspeicher sind leer und die Zellen können sich nicht teilen.

Abbildung 5



Streulichtintensität in Abhängigkeit Winkel und Konzentration: (A) Kieselalge *Phaeodactylum tricornutum*, (B) Coccolithophoride *Emiliania* sp., (C) Grünalgen *Chlorella autotrophica* und (D) *Brachiomonas* sp.

Trotz der morphologischen Unterschiede zeigten die Mikroalgen ähnliche konzentrationsabhängige Charakteristika der Lichtstreuung wie Microbeads (Abb. 5). Das könnte bedeuten, dass durch die große Zahl der Zellen unterschiedliche Signale von einzelnen Zellen herausgemittelt werden und/oder, dass die Zellwände weniger zur Lichtstreuung beitragen als subzelluläre Strukturen wie Plastiden (Chloroplasten und Mitochondrien) und Einschlüsse (Öltröpfchen), die alle mehr oder weniger kugelförmig sind.

#### 4. Untersuchungen an wachsenden Kulturen

Periodische, tageszeitabhängige Prozesse beeinflussen die optische Dichte und den Brechungskoeffizienten von Zellen im sichtbaren Licht (Stramski und Reynolds, 1993). Um die Auswirkung im NIR zu messen, wurden auf der Grundlage der Arbeit von Sandnes et al. (2006) Transmissions-Sensoren zur Messung der optischen Dichte (Extinktion) bei 880 nm gebaut. Die Steuerung der Sensoren und die Datenerfassung erfolgte über ein LabVIEW Programm mit einem NI-DAQ (National Instruments Data Acquisition Device, USB-6008).

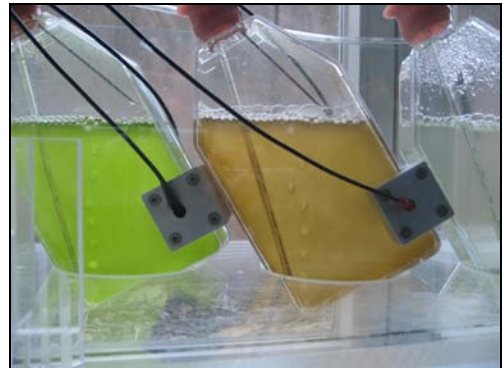
Die Sensoren wurden an flachen Zellkulturflaschen der Firma Greiner (Schichtdicke 46,3 mm) angebracht, die als Modelle für Flachplattenreaktoren dienen (Abb. 6). Die Algen wuchsen in künstlichem Meerwasser (400 ml) mit zusätzlichen Nährstoffen für Algen. Die Kulturen wurden mit steril filtrierter Luft begast. Als Energiequelle für das Wachstum diente Sonnenlicht, das durch einen Lichtschacht an einem nach Westen ausgerichteten Fenster in das teilweise unter der Erde liegende Labor eindrang (Abb. 6).

#### Abbildung 6

*Set-up mit Algensensoren an Zellkulturflaschen;  
Aufstellung am Laborfenster in einem Licht-  
schacht*

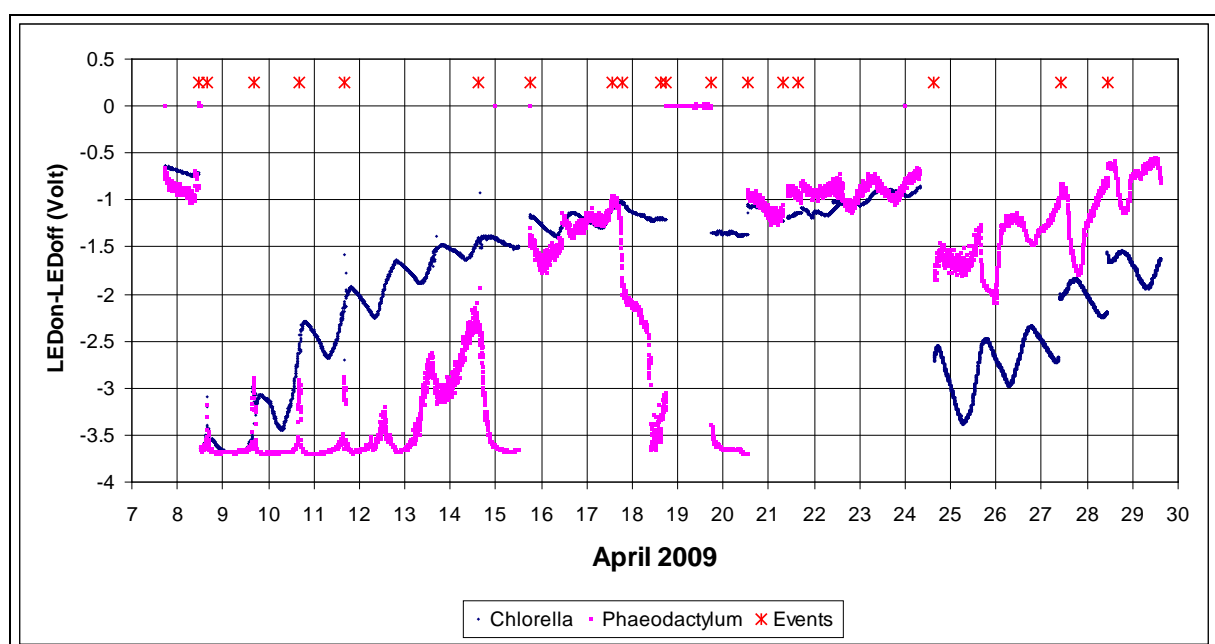
*Grüne Kultur: Chlorella autotrophica CCMP  
243 (CCY 9931); braune Kultur:  
Phaeodactylum tricornutum UTCC 162 (CCY  
9811)*

Abkürzungen: CCY :Cultur Collection Yerseke  
(NIOO-CEME, Niederlande); UTCC University of  
Toronto Culture Collection, Kanada; CCMP Culture  
Collection of Marine Phytoplankton, USA



Da die Kulturen an einem Fenster in einem Lichtschacht standen, erreichte die Algen vorwiegend diffuses Licht. Nur bei schönem Wetter strahlte die Sonne zwischen 16 und 17 Uhr direkt auf die Flaschen. Um den dabei stark wechselnden IR-Anteil des Sonnenlichts und eine elektronische Drift des Signals auszuschließen, wurde für die Auswertung die Differenz aus Messwerten (Mittelwerte aus je 100 Messwerten, erfasst in 100 msec) mit und ohne Messlicht (LED) aufgezeichnet (Abb. 7).

#### Abbildung 7

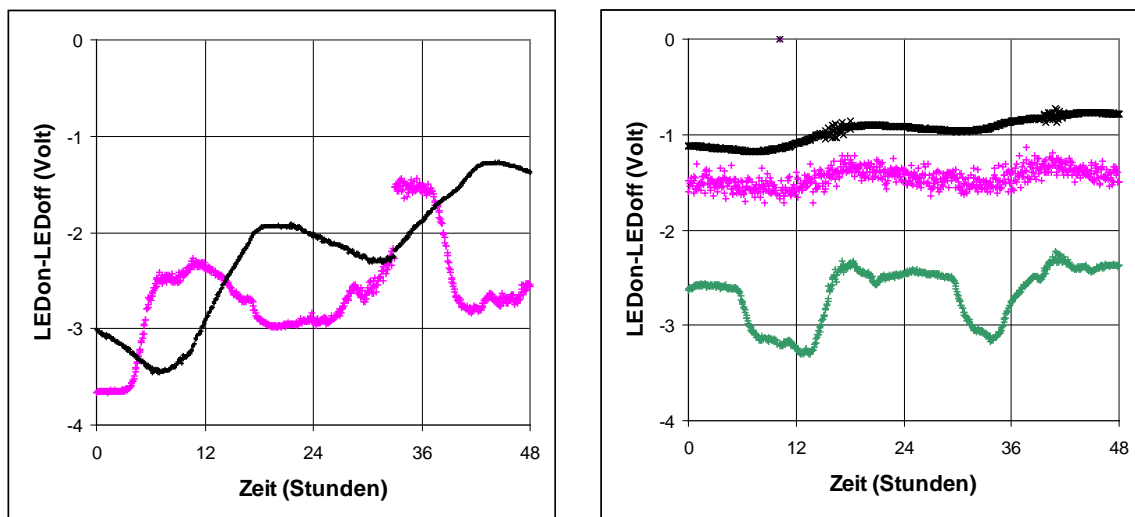


Transmission des LED-Lichts (880 nm) durch eine *Chlorella*- und eine *Phaeodactylum* -Kultur (siehe Abb.6).

Am 8. und 24. April wurden die Kulturen verdünnt (Lichtsättigung der Photodiode bei -3,7V:). Mit bloßem Auge war zu sehen, dass sich die braune Kieselalge *Phaeodactylum* und die Grünalge *Chlorella* (Abb. 6) nach den Verdünnungen sehr unterschiedlich entwickelten. Auch wenn der Kompressor ausfiel (14.4 und 18.4) war unschwer ein Unterschied festzustellen: ohne die durch Gasbläschen verursachte Turbulenz sedimentierten die *Phaeodactylum*-Zellen rasch und reicherten sich am Boden der Kulturflasche an. Die kleineren *Chlorella*-Zellen hielten sich dagegen auch ohne Begasung recht lange im Wasserkörper. Mit dem Algensensor wurden diese und viele andere Ereignisse, auf die hier nicht eingegangen werden soll, zeitgenau festgehalten (Abb. 7)

Mit Tageslicht als einziger Energiequelle müssen photosynthetische Organismen regelmäßig Energie für Zeiten ohne Licht speichern. Zudem müssen die Energie-liefernden und -zehrenden Prozesse so miteinander verknüpft werden, dass die vorhandene Energie auch für die Durchführung komplexer Prozesse wie die Verdoppelung des Erbguts und die Zellteilung ausreicht. In genetisch homogenen Monokulturen führt diese Verknüpfung zu einer Synchronisation von Vorgängen auf der subzellularen Ebene, die unseren Augen verborgen bleibt. Eine kontinuierliche Messung der optischen Dichte mit dem Algensensor zeigte jedoch in jungen Kulturen, in welchen sich ein großer Teil der Zellen täglich teilen, eine überraschend deutliche, artspezifische Synchronisation von Prozessen, die die optische Dichte beeinflussen (Abb. 7 und 8). Erst wenn die Zellzahl aufgrund von Energie- und/oder CO<sub>2</sub>-Mangel kaum mehr zunahm, vereinheitlichten sich die Tagesgänge (Abb. 8B, *Chlorella*, *Phaeodactylum*).

Abbildung 8



A: Tagesgänge der Transmission am 17. und 18. Mai von jungen Kulturen von *Chlorella autotrophica* (schwarz) und *Phaeodactylum tricornerum* (pink)

B: Tagesgänge am 2. und 3. Juni 2009: *Brachiomonas* sp. (grün, junge Kultur), sowie dichte Kulturen von *Chlorella* (schwarz) und *Phaeodactylum* (pink).

Durch Zellteilung und Wachstum verändern sich Partikelkonzentration und Beschattungsfläche und damit auch Extinktion und Streulicht einer Kultur. Im Folgenden ziehen wir die in Abschnitt 3 an Microbeads abgeleiteten Zusammenhänge zu einer qualitativen Interpretation der Messdaten von wachsenden Kulturen heran. An Microbeads stellten wir fest, dass sich bei

einer Zunahme der Konzentration der Partikel Extinktion und Lichtstreuung vergrößern (Abb. 4). Bei gleicher Konzentration haben jedoch größere Partikel kleinere Streulicht- und Extinktionskoeffizienten (Abb. 5A und B).

*Chlorella autotrophica*: Aus dem Tagesgang der optischen Dichte (Extinktion) der ein Minimum zwischen 7:20 und 8:10 Uhr und ein Maximum zwischen 19:10 und 19:40 Uhr zeigte (Abb. 7 und 8A), kann man ableiten, dass die morgens beginnende Zunahme auf einer Erhöhung der Zellzahl durch Teilung beruht. Die Teilungen scheinen gegen Abend aufzuhören. Im Laufe der folgenden Nacht, also ohne Licht und Photosynthese, vergrößern sich die Zellen (Abnahme der Extinktion) und erreichen in den Morgenstunden die Größe, bei der sie sich erneut teilen. Eine gleichlaufende, aber schwächere, optische Signatur ist auch dann noch sichtbar, wenn Licht oder der CO<sub>2</sub> Anteil der Luft eine weitere Zunahme der Zellzahl verhindert (Abb. 8B). Zu- und Abnahme der Extinktion (Abb. 8B) scheinen in diesem Fall mit der Einlagerung und dem Verbrauch von in Stärke gespeicherten Energie zu korrelieren (Ernst et al. 1990).

*Phaeodactylum tricornutum*: Die optische Dichte zeigte tägliche Maxima zwischen 11:30 und 13:20 (Abb. 8A). Danach verringerte sie sich rasch, was möglicherweise auf eine rasche Zunahme des Volumens der streuenden Struktur hindeutet. Nach 20:30 Uhr erhöhte sich die optische Dichte, was bedeutet, dass sich die Licht-brechende Strukturen bei Nacht teilen. Da bei dieser Alge Zellkörper und Chloroplasten unterschiedliche Formen haben (siehe Abb. 1), ist nicht klar, welche der beiden Strukturen für dieses optische Signal verantwortlich ist.

*Brachiomonas* sp.: Bei dieser Grünalge vergrößerte sich die optische Dichte zwischen 11 Uhr und 13 Uhr sehr plötzlich. Die rasche Zunahme der Extinktion könnten wir als sehr starke Synchronisation der Zellteilung deuten. In der darauf folgenden Phase scheinen Prozesse mit optisch gegenläufigen Wirkungen aufzutreten, die das Signal an vielen Tagen stabilisierten bis gegen 6 Uhr morgens eine ziemlich abrupte Verringerung der Extinktion eintrat. Sowohl bei *Brachiomonas* als auch bei *Phaeodactylum* könnte die komplexe Zellform das optischen Signals insbesondere bei der Zellteilung beeinflussen. Welche Ursache die für diese beiden Algen typischen, schnellen Veränderungen der optischen Dichte haben, konnte im Rahmen dieser Studie nicht geklärt werden.

## 5. Kritische Betrachtung der Ergebnisse

Diese Untersuchung zeigte, dass sich optische Dichte und die Lichtstreuung von Mikroalgen artspezifisch mit der Tageszeit verändern. Mit Hilfe von Untersuchungen an Microbeads lies sich ein Teil dieser Veränderungen auf eine durch das Tageslicht synchronisierte Zellteilung und die damit verbundene Verkleinerung und die daran anschließende Vergrößerung der wachsenden Zellen zurückführen. Darüber hinaus beeinflussen jedoch auch physiologische Prozesse, z. B. bei der Speicherung von Energie, die optischen Eigenschaften der Zellen im NIR. Welche Rolle die Zellform bei den sehr ausgeprägten Veränderungen in den Tagesgängen von 2 der 3 untersuchten Algen spielte, konnte im Rahmen des Projektes nicht geklärt werden. Eine Unterscheidung von Algenarten in Mischkulturen mit Hilfe eines direkten Vergleichs von Vorwärts- und Rückwärtsstreuung, das Messprinzip, das dem Nebel- und Verschmutzungssensor zugrunde liegt, scheint jedoch aufgrund der Komplexität der optischen Signale von Algen nicht realisierbar.

Dagegen ist es jedoch durchaus denkbar, die kontinuierlich aufgezeichneten, artspezifischen, Tagesgänge der optischen Dichte zur Beurteilung der Reinheit und Qualität von Monokulturen heranzuziehen.

## 6. Ausblick

Der Algensensor in seiner vorliegenden Form soll im Bereich Aquakultur der HTW eingesetzt werden, um Wachstum und Qualität von Algenmonokulturen kontinuierlich zu überwachen und, in einem weiteren Schritt, die Algenzucht zu automatisieren. In diesem Zusammenhang wird angestrebt, den Messbereich des Sensors zu vergrößern, um das Wachstum und tageszyklische Veränderungen sowohl in dünnen als auch in dichten Kulturen messen zu können.

## 7. Literaturverzeichnis

- Ernst, A., Liu, Y.-D., Reich, S. and Böger, P., 1990. Diurnal nitrogenase modification in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Botanica Acta*, 103: 183-189.
- Babin, M. and Stramski, D. 2002. Light absorption by aquatic particles in the near-infrared spectral region. *Limnol. Oceanogr.*, 47(3), , 911-915.
- Brennan, L., Owende, P. 2010. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14: 557-577.
- Chisti, Y. 2008. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology* Vol.26: 126-131.
- Davey H. M. Kell, D.B. (1996) Flow Cytometry and Cell Sorting of Heterogeneous Microbial Populations: the Importance of Single-Cell Analyses. *Microbiological Reviews*, 60: 641-696.
- Sandnes J.M., Ringstad T., Wenner D., Heyerdahl P.H., Källqvist T., Gislerød, H.R., 2006, Real-time monitoring and automatic density control of large-scale microalgal cultures using near infrared (NIR) optical density sensors. *Journal of Biotechnology*, 122: 209-215.
- Stramski, D., Reynolds, R.A. 1993. Diel variations in the optical properties of a marine diatom. *Limnol. Oceanogr.*, 38(7), 1993, 1347-1364
- Wyatt, P.J. and Jackson, C. 1989, Discrimination of phytoplankton via light-scattering properties. *Limnol. Oceanogr.*, 34: 96-112.

### Danksagung:

Das Projekt wäre nicht in dieser Form durchführbar gewesen, wenn die Biologin im Projekt (A.E.) nicht von vielen Kollegen unterstützt worden wäre. Besonderen Dank gebührt Herrn Prof. Schultes und seinen Mitarbeiter/innen, insbesondere T. Kuberczyk, ohne den der Anfang richtig schwer geworden wäre. Herrn Prof. M. Möller danken wir für die Programmierung des Messgeräts, den Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe und Herrn Blaes für die Hilfen beim Aufbau der Versuche.