

Titel: In-vivo Identifizierung und Differenzierung von PHB produzierenden Mikroorganismen mittels Raman – Mikrospektroskopie

Einleitung: Die Kontamination von Boden und Wasser mit Plastik ist zu einem globalen Umweltproblem geworden. Die Biotechnologie ist hier gefordert, effiziente Herstellungsverfahren für kompostierbare Stoffe zu etablieren. Ein vielseitig einsetzbares Biopolymer ist Poly-β-hydroxybutyrat (PHB), welches zu wasserfesten und biologisch abbaubaren Werkstoffen verarbeitet werden kann. Es wird hauptsächlich fermentativ produziert, auch mit Hilfe von photo-autotrophen Cyanobakterien. Zurzeit werden die PHB-produzierenden Stämme mit Hilfe von Analysen identifiziert, die zeitaufwendig sind und nur einen Summenparameter für die Gesamtmenge an PHB liefern. Eine Quantifizierung des Anteils an PHB-produzierenden Bakterien innerhalb einer Kultur, bzw. deren Differenzierung bezüglich der eingelagerten Menge je Zelle ist nicht auf einfache Weise möglich. [1] Raman-Mikrospektroskopie ist eine nicht-destruktive, markierungsfreie und sensitive Methode, um die interessierenden Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung von jeder einzelnen Zelle zu erfassen. Die Vorteile der Methode liegen in der einfachen Probenvorbereitung, der schnellen Datenaufnahme (Messdauer von einigen Sekunden), und der hohen örtlichen Auflösung im sub-µm Bereich. Die Darstellung der chemischen Eigenschaften der Probe kann entweder bildgebend als Mapping erfolgen, oder mittels Hauptkomponentenanalyse (PCA), einem Werkzeug der multivariaten Datenanalyse, durchgeführt werden. So können die mehrdimensionalen spektralen Daten komprimiert und erwünschte Parameter selektiv extrahiert und visualisiert werden. [2]

Methode: Der Arbeitsablauf einer Raman-Messung von der Probenvorbereitung über die Datengenerierung bis hin zur statistischer Auswertung ist in Abbildung 1 dargestellt. Für die Analyse wurden die Raman Spektren basislinienkorrigiert und vektornormiert. Der spektrale Bereich wurde von 400-1750 cm^{-1} in der PCA ausgewertet.

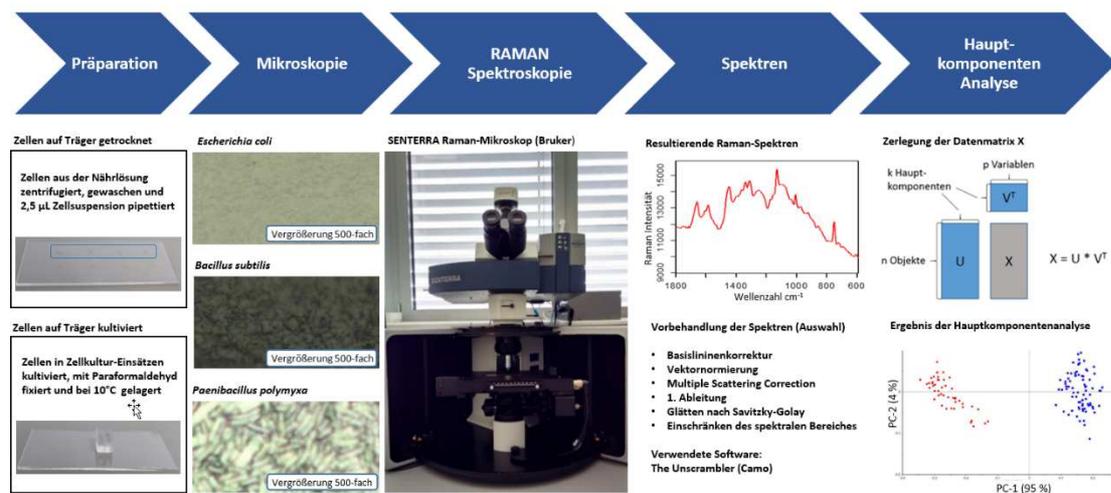


Abbildung1: Arbeitsablauf der Raman - Mikrospektroskopie

Ergebnisse: Mittels eines Modellversuches mit drei gut erforschten Bakterienspezies der Risikostufe 1, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus polymyxa*, konnte gezeigt werden, dass die Kombination aus Raman-Mikrospektroskopie und Hauptkomponentenanalyse für die In-vivo Differenzierung von Zellen geeignet ist (Abbildung 2).

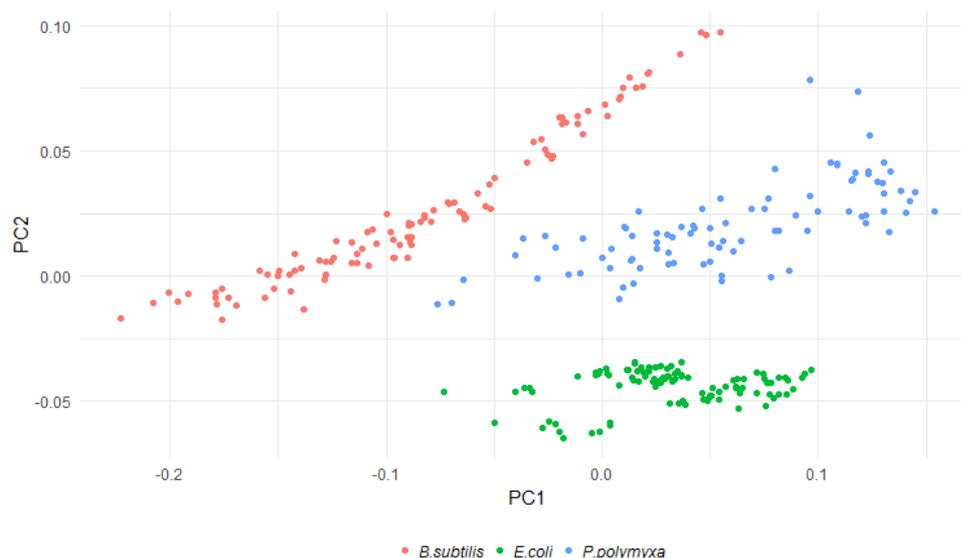


Abbildung 2: Scoreplot PCA: *B. subtilis* (rot), *E. coli* (grün), *P. polymyxa* (blau).

Der Scoreplot der PCA (PC-1 gegen PC-2 in Abbildung 2) zeigt drei deutlich abgegrenzte Gruppen. Die erste Hauptkomponente (PC-1) erklärt 76 % und die zweite Hauptkomponente (PC-2) erklärt 17 % der gesamten Varianz in den Daten. Die ermittelten Spektren der einzelnen Mikroorganismen zeigen Unterschiede in der Signalposition und Signalintensität. Jeder Messpunkt entspricht einem Spektrum, jede Gruppe entspricht einer Spezies.

Diskussion/Conclusio: Die Ergebnisse verdeutlichen, dass Unterschiede im Fingerprintbereich des Spektrums feststellbar sind und zur Differenzierung der Zellen genutzt werden können. Mittels einer PCA war es möglich die erhaltenen Spektren zu gruppieren und somit die drei Spezies zu unterscheiden. Das Ziel der aktuellen Arbeit ist die Etablierung einer Raman-Mikrospektroskopie Methode, die es ermöglicht PHB produzierende Cyanobakterien In-vivo hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Einlagerung von PHB zu identifizieren und zu differenzieren. Der zukünftig geplante Routine-Einsatz dieser Methode soll eine wesentliche Unterstützung in der effizienten biotechnologischen Produktion biologisch abbaubarer Werkstoffe liefern.

[1] Meixner K et al. 2016. Processing recommendations for using low-solids digestate as nutrient solutions for poly- β -hydroxybutyrate production with *Synechocystis salina*. *J Biotechnology* 240: 61-67

[2] Lorenz et al. 2017. Cultivation free Raman investigations of bacteria. *Trends in Microbiol.* 25: 413-424