

Fotoshooting unterm Mikroskop **Algen werden computergestützt charakterisiert**

Kostenlose Reinigung – Grundwasserökologie

Eine Reaktion, zwei Funktionen – Glykosyltransferasen

Wie erneuern sich Organe? GSF gründet Institut für Stammzellforschung

Über den Wolken – Strahlenexposition

Aus der Luft gegriffen – Leguminosen haben Konkurrenzvorteil

Den Waldboden im Visier – Lachgasemission

Fotoshooting unterm Mikroskop

Objektiv und dauerhaft werden Algen computergestützt charakterisiert

Kugeln oder Birnen, Rechtecke in allen Variationen, zarte Fäden oder ganz unregelmäßig geformte Gebilde, in jedem Fall aber winzig klein – so präsentiert sich Phytoplankton im Mikroskop. Algen sind eine äußerst vielgestaltige Pflanzengruppe, und viele von ihnen bilden zudem unter ungünstigen Lebensbedingungen auch noch besondere Stadien, die wieder ganz anders aussehen. Um Algen sicher zu klassifizieren, bedarf es erfahrener Biologen – oder einer ausgefeilten, computergestützten Technik. Genau daran arbeitet eine Gruppe von Wissenschaftlern des GSF-Instituts für Biomathematik und Biometrie. Dr. Dipl.-Biol. Burkhard Hense, Dipl.-Math. Karsten Rodenacker, Dipl.-Math. Uta Jütting und Dipl.-Ing. Peter Gais wollen mit ihrer Automatisierten Planktonstruktur-Analyse (PLASA) Phytoplankton weitgehend durch den Computer auswerten lassen, Stichwort: digitale Bildanalyse.

■ Von Interesse ist das Algeninventar von Flüssen und Seen, weil die detaillierte Analyse der Algenarten und ihrer Häufigkeit zu erkennen gibt, wie es um die Qualität des Wassers bestellt ist. Ökologische und ökotoxikologische Gewässeruntersuchungen kommen ohne solche Informationen nicht aus. Vor 30 Jahren belasteten zum Beispiel Wasch- und Reinigungsmittel Gewässer, heute fragt man nach den Folgen von Hormonrückständen, die über menschliche Ausscheidungen ins Wasser gelangen. Also sitzen Fachleute wochenlang am Mikroskop, bestimmen und zählen Algen. Das soll dank PLASA bald Vergangenheit sein. Zwar gibt es bereits automatisierte Verfahren, mit denen winzige Organismen grob bestimmt werden können, allerdings höchstens bis zur jeweiligen Algenklasse. Erst mit der digitalen Analyse mikroskopischer Bilder lassen sich die genauen Arten erkennen.

■ Doch bevor neueste Technik zum Einsatz kommt, bereiten die Wissenschaftler die Wasserproben nach dem klassischen Utermöhl-Verfahren auf. „Wir füllen das Wasser in einen unten offenen Glaszylinder mit definiertem Volumen, der über einer runden Probenkammer von 2,5 Zentimeter Durchmesser steht“, erklärt Rodenacker. „Mit Chemikalien töten wir die Lebewesen darin ab, sie sinken zu Boden und sedimentieren in der Kammer. Dann wird der Zylinder zur Seite und gleichzeitig

ein Deckglas über die Kammer geschoben, die damit geschlossen ist. Da nur solche Organismen auswertbar sind, die – möglichst einzeln – am Boden der Kammer liegen, darf die Algendichte nicht zu hoch sein. Vor allem im Sommer müssen wir die Proben oft verdünnen und später entsprechend rückrechnen, um die Algenmenge zu bestimmen.“

■ Alles Weitere geschieht automatisch. Computergesteuert werden unter einem Inversmikroskop von 200 bis 250 Bildfeldern pro Kammer jeweils drei Aufnahmen mit dem 40er-Objektiv und noch einmal drei mit dem 20er-Objektiv geschossen, um auch größere Objekte zu erfassen. Die digitalen Bilddaten dienen auch der Fixierung und Archivierung sämtlicher Wasserproben; denn die lassen sich im Original nicht unbegrenzt aufbewahren.

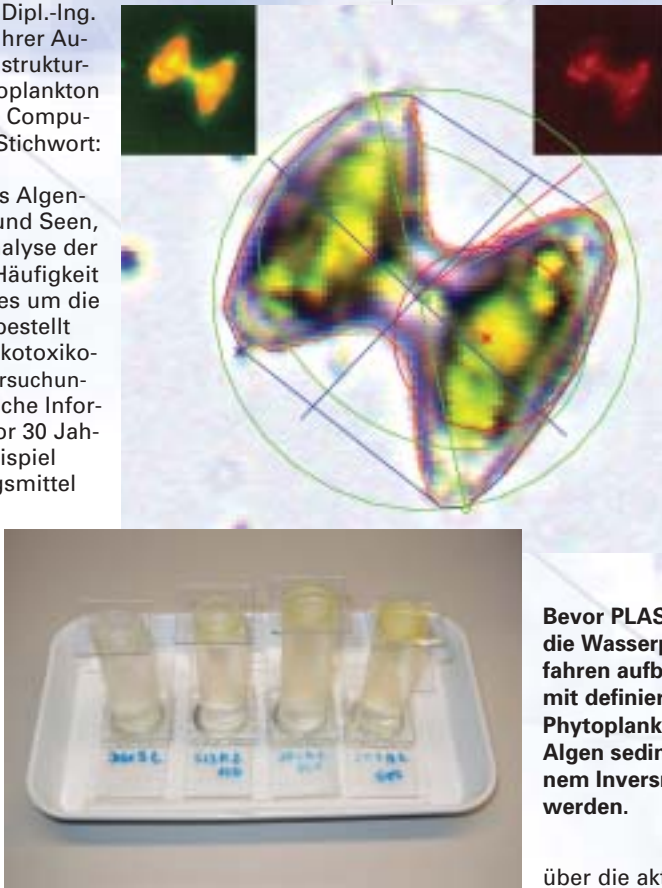
■ Die drei Aufnahmen pro Bildfeld und Objektiv sind je ein Hellfeld- und zwei Fluoreszenzbilder. Eine der Fluoreszenzaufnahmen macht das in lebenden und frisch abgetöteten Algen enthaltene Photosynthese-Pigment Chlorophyll a sichtbar. Algen, die schon längere Zeit tot sind, werden ausgeschlossen, weil sie nichts

Mit Hilfe der Automatisierten Planktonstruktur-Analyse (PLASA) werden 50 bis 60 Maßzahlen erhoben, um eine Alge zu klassifizieren. Foto: Karsten Rodenacker

Bevor PLASA zum Einsatz kommt, werden die Wasserproben nach dem Utermöhl-Verfahren aufbereitet: In einem Glaszylinder mit definiertem Wasservolumen wird das Phytoplankton abgetötet. Erst nachdem die Algen sedimentiert sind, können unter einem Inversmikroskop Aufnahmen gemacht werden. Foto: Uta Jütting

über die aktuelle Wassergüte aussagen. Das zweite Fluoreszenzbild zeigt Pigmente wie das Phycoerythrin, das manche Algen zusätzlich besitzen.

■ In den Hellfeldaufnahmen werden zunächst mikroskopbedingte Farbverschiebungen und Artefakte korrigiert. Dann passiert das, was sonst Biologen machen: Die in Frage kommenden Objekte werden ausgewählt – mittels einer Intensitätsschwelle vom hellen Hintergrund abgetrennt –, vermessen und klassifiziert. Das Rechnerprogramm umrahmt sie mit einer feinen roten Linie; die Kontur, die so genannte Segmentierung, kann das System mittlerweile sehr gut festlegen. Dann werden für jedes Objekt rund 200 numerische Merkmale berechnet. Kriterien sind Form, Farbe, optische Dichte und – in den Fluoreszenzbildern – Fluoreszenzintensität. Allein für die Form werden rund 50 bis 60



Kostenlose Bakterien halten das

„Grundwasser ist keine sterile Resource, aus der wir unbegrenzt schöpfen können“, sagt Dr. Christian Griebler vom GSF-Institut für Grundwasserökologie. Neben Bakterien und Protozoen leben im Lückenraum von Grundwasserleitern auch Würmer, Schnecken und kleine Krebse. In Höhlengewässern gibt es sogar Lurche und Fische. Alle sind dem lichtfreien Milieu entsprechend pigmentlos und blind. Während sich Invertebraten vor allem in oberflächennahen Grundwasserzonen mit ausreichend Sauerstoff aufhalten, leben Bakterien bis in Tiefen von mehreren Kilometern.

„Grundwasserleiter sind dynamische Ökosysteme“, erklärt Griebler. „Bei den Bakterien vermutet man eine ähnliche Bandbreite an Arten wie in Oberflächengewässern, allerdings in niedrigerer Dichte.“ Denn ein geringes Nährstoffangebot und niedrige Temperaturen lassen den Stoffwechsel der Organismen langsamer ablaufen, die Zellen teilen sich weniger oft. Ändern sich aber die Umweltbedingungen, kann das System dank seiner Diversität und Heterogenität flexibel darauf reagieren: Die nun begünstigten Arten müssen sich nur noch vermehren.

„Das Grundwasser für den Menschen genießbar ist, verdanken wir vor allem biologischen Reinigungsprozessen. Zwar sind der Boden und die darunter liegenden Sedimentschichten gute mechanische Filter für größere Partikel, und Schwermetalle können durch chemische Reaktionen in den Sedimenten zurückgehalten werden. Für den Abbau der meisten Schadstoffe und den Umsatz von Nährstoffen sind jedoch die Mikroorganismen verantwortlich. Sie reinigen das Grundwasser bis hin zur Trinkwasserqualität und erhalten es kostenlos auch über Jahrmillionen in hygienisch einwandfreiem Zustand. „Das ganze System ist so effektiv, dass etwa Flusswasser nach einer Fließstrecke von 50 Metern im Sediment bereits Trinkwasserqualität erreicht hat“, erklärt Griebler. Aber Grundwasserleiter ist nicht gleich Grundwasserleiter. Karstsysteme haben im Unterschied zu porösen Sedimentsystemen ein nur geringes Selbstreinigungspotential. Hier rauscht das Wasser mit hoher Geschwindigkeit durch und die meist feststehenden Bakterien haben zu wenig Zeit, Schadstoffe abzubauen.

„Ob Benzin, Pestizide, Nitrat oder Eisen, grundsätzlich können Bakterien alle Stoffe über verschiedenste Stoffwechselwege umsetzen: in sauerstoffreichen Abschnitten über die aerobe Atmung, in sauerstofffreien Bereichen beispielsweise über Denitrifikation, Eisenreduktion oder Sulfatreduktion. Gelangen Schad- oder Nährstoffe allerdings in zu hohen Konzentrationen ins Grundwasser, ist auch der biologische Abbau nicht uneingeschränkt möglich: Den Mikroorganismen fehlen etwa ausreichend Kohlen- oder Sauerstoff, um das Material umwandeln zu können. Besonders durch die intensive Dün-

puter in dieser Hinsicht nicht ganz mit der visuellen Auswertung durch Spezialisten mithalten, aber er lernt ständig hinzu und wird immer perfekter. ■ Trainiert wurde PLASA zumeist anhand von Wasserproben aus einem Teich auf dem GSF-Gelände, und auch an Proben von Limnologen der Ludwig-Maximilians-Universität München musste PLASA sich bewähren. Fünf Monate lang hatten die Wissenschaftler Proben genommen, um die Struktur des Phytoplanktons im Verlauf eines Jahres darzustellen – und natürlich auch, um PLASA in einem Langzeitexperiment zu testen.

■ Die Methode reduziert den notwendigen Arbeitsaufwand erheblich. Sie ermöglicht eine im Vergleich zum manuellen Auszählen objektivere Analyse und dient, da die Bilder im Gegensatz zu den Wasserproben unbegrenzt haltbar sind, zusätzlich der Qualitätssicherung. Es ist denkbar, das Probenmaterial auch später unter anderen Fragestellungen auszuwerten. Sobald es ausgereift ist, kann man mit dem Verfahren verschiedene ökologische und ökotoxikologische Fragen klären, vor allem solche, bei denen Zeitreihen im Vordergrund stehen. Dazu zählt zum Beispiel, wie sich ein verändertes Klima oder Umschläge beim Nährstoff- beziehungsweise Schadstoffeintrag auf das Ökosystem See auswirken. Weitgehend automatisierte Langzeitmonitorings erlauben es, die Dynamik von Algenpopulationen in Gewässern nachzuverfolgen oder längerfristige Fluktuationen in der Organismengröße und der Biomasse zu erfassen. Und auch in ganz anderen Bereichen könnte PLASA von Nutzen sein, lässt Rodenacker seine Phantasie spielen: „Die Analyse von Pflanzenpollen verläuft nach ganz ähnlichen Mustern. Vielleicht ist unser System ja auch für solche Analysen geeignet.“

■ Sibylle Kettembeil

Literatur:

B.A. Hense, K. Rodenacker, U. Jütting, P.

Gais: Use of fluorescence for automatized phytoplankton screening by image analyses in ecotoxicology. In Vorbereitung.

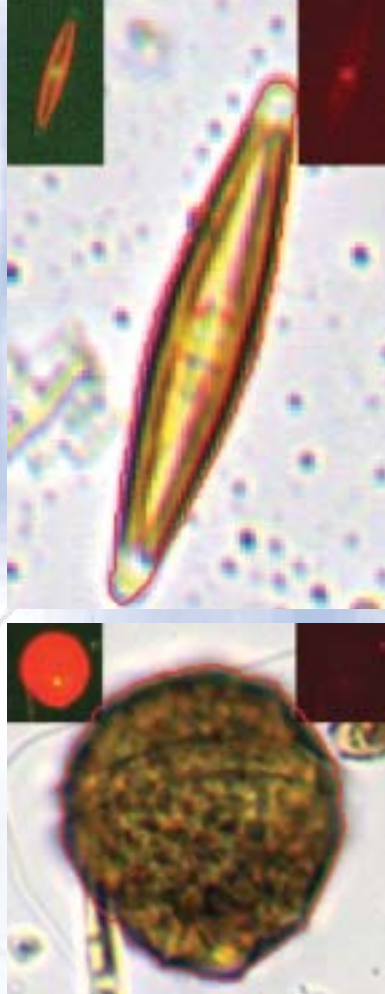
U. Jütting, B.A. Hense, K. Rodenacker, P.

Gais: (Teil-) Automatisierte Analyse der Phytoplanktonzusammensetzung nach der Utermöhl-Methode. Tagungsband der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Limnologie, Köln, Oktober 2003.

K. Rodenacker et al.: (Semi-)automatic recognition of microorganisms in water. In Proc. ICIP (2001) 30–33, Thessaloniki, Greece, 2001. IEEE. IE-EE Catalog Number: 01CH37205C, ISBN: 0-7803-6727-8. http://www.gsf.de/ibb/homepages/rodenacker/Misc_WWW/pdf/3974.pdf

K. Rodenacker, B. A. Hense, U. Jütting, P.

Gais: Automatical analysis of water specimens for estimation of phytoplankton structure. In Vorbereitung.



Ob rund, rechteckig oder wie hier länglich-oval ist entscheidend, um Algen zu klassifizieren. Das Computerprogramm legt die Kontur fest, indem es die Organismen mit einer Linie umrahmt. Foto: Karsten Rodenacker

Maßzahlen erhoben, denn Formkriterien sind schwer fassbar, was Quantifizierung und visuelle Unterscheidung betrifft. Aufschlussreich sind etwa Parameter der Ausdehnung. Beispielsweise werden das Rechteck und der Kreis bestimmt, in die das Objekt gerade hineinpasst, sowie solche, die Abweichungen von glatten Formen beschreiben. Die Färbung wird im ‚Lab-System‘ gemessen, das der physiologischen Farberkennung des Menschen am nächsten kommt. Maßzahlen der optischen Dichte sind die gesamte Extinktion sowie diejenige am Rand und in dunklen und hellen Partikeln des Objekts. Bei der Fluoreszenzmessung geht es um Intensität und Verteilung der fluoreszierenden Partikel.

■ Sämtliche Messwerte fließen in den automatischen Klassifikator ein. Er benennt etwa eine Alge als Kieselalge, wenn sie nach allen berücksichtigten Kriterien zweifelsfrei als solche zu erkennen ist. Noch kann der Com-