

(TEIL-)AUTOMATISIERTE ANALYSE DER PHYTOPLANKTON-ZUSAMMENSETZUNG NACH DER UTERMÖHL-METHODE

Jütting, Uta^{1*}, Hense, Burkhard A.¹, Rodenacker, Karsten¹, Gais, Peter²

¹Institut für Biometrie und Biomathematik, ²Institut für Pathologie, Ingolstädter Landstr. 1, 85764 Neuherberg;

*Tel. 089/31872555, Fax 089/31873029; Email: uta.juetting@gsf.de

Keywords: Phytoplankton, Strukturanalyse, Algenidentifizierung, Bildanalyse, Autofluoreszenz

Zusammenfassung

Die manuelle taxonomische Analyse von Phytoplanktonproben am Mikroskop ist sehr arbeitsaufwändig. Es wurde ein Verfahren entwickelt, das ausgehend von der Utermöhl-Methode die Untersuchung mit Hilfe eines computerisierten Mikroskopes sowie von Bildanalyseverfahren automatisiert. Dabei werden Phytoplanktonproben am Mikroskop gescannt, d.h. es werden statistisch auswertbar Bilder digitalisiert. Je nach Fragestellung können dabei die Bildzahl und die verwendeten Objektive eingestellt werden. Die erfassten Bilder werden durch Segmentations- und Klassifikationsschritten weitgehend automatisch analysiert. Prinzipiell ist dabei die Verwendung von mit Lugol'scher Lösung fixierten Proben möglich. Um die Qualität zu verbessern, wurde das Verfahren auf Glutaraldehyd-fixierte Proben umgestellt. Diese Fixierung konserviert die Farbinformation und die Autofluoreszenz. Das Probenscann-Verfahren wurde so verändert, dass von allen Positionen zusätzlich zu den Hellfeldbildern Fluoreszenzbilder akquiriert werden können, die dann in der Bildanalyse benutzt werden. Derzeit werden zwei Fluoreszenzfiltersätze verwendet zum Nachweis von Chlorophyll a und Phycoerythrin. Damit können zum einen Algen- von Nichtalgen-Objekten unterschieden werden, und zum anderen ist eine taxonomische Voridentifikation phycoerythrinhaltiger Crypto- und Cyanophyceen möglich. Die Verwendung von Farb- und Fluoreszenzinformationen verbessert die Qualität einer rein morphologischen Phytoplanktonanalyse erheblich.

Einleitung

Für Untersuchungen der Struktur des Phytoplanktons, die eine zentrale Rolle in verschiedenen Bereichen z.B. der Ökologie/Ökotoxikologie spielen, ist es oft notwendig, die Spezies detailliert taxonomisch zu beschreiben und zu quantifizieren. Ein dafür verwendetes Verfahren stellt die Utermöhl-Methode dar, bei der mit Lugol'scher Lösung fixierte Proben im Mikroskop ausgezählt werden [1]. Identifizierung und Quantifizierung durch Fachkräfte sind jedoch arbeitsaufwendig und kostenintensiv. Die meisten existierenden mehr oder weniger automatisierten Verfahren (z.B. Durchflusszytometrie) sparen Zeit, jedoch auf Kosten der taxonomischen Auflösung [2, 3]. Eine Lösungsmöglichkeit stellt die automatische Bildanalyse dar. Sie besitzt den Vorteil, unter Verwendung konventioneller Werkzeuge (Mikroskop und Computer) (fast) den gleichen Grad an taxonomischer Auflösung zu ermöglichen wie manuelles Mikroskopieren. Dass sie bislang nur begrenzt Einzug in die Praxis gewonnen hat, liegt v.a. an Schwierigkeiten einer automatisierten, standardisierten Datenerfassung am Mikroskop, der eindeutigen Klassifikation der gefundenen Objekte sowie der Vielzahl der verschiedenen Organismen.

Im folgenden wird die Entwicklung einer automatisierten Phytoplanktonstrukturanalyse beschrieben. Ausgangspunkt war zunächst die Notwendigkeit, eine große Menge an Phytoplanktonproben zu bearbeiten, die in Mikrokosmosstudien zur Untersuchung des ökotoxischen Potentials von Umwelthormonen anfielen [4, 5].

Analyse von mit Lugol'scher Lösung fixierten Phytoplankton-Proben

Probenaufbereitung

Die Mikrokosmen bestanden aus Stahlzylindern (80 cm Höhe, 60 cm Durchmesser) und wurden mit Sediment und Wasser aus dem Ammersee (Bayern) gefüllt. Sie standen in einem Teich, um einen naturnahen Temperaturverlauf zu gewährleisten. Bei jeder Probenahme mit einem Wasserschöpfer (stainless steel water column sampler) je drei 0.5 l Proben entnommen und gemischt. Davon wurde für die Phytoplanktonauswertung 100 ml mit Lugol'scher Lösung fixiert und entsprechend der Utermöhl-Methode in Planktonkammern sedimentiert. Als Referenz dienten die Ergebnisse einer konventionell durchgeführten manuellen Identifizierung und Quantifizierung der Phytoplanktontaxa an einem Umkehrmikroskop (DM IRBE, Leica, Bensheim, Deutschland).

Bildeinzug

Die Bilderfassung erfolgte an einem computergesteuertes Umkehrmikroskop (DM IRBE, Leica, Bensheim, Deutschland). Dazu wurde ein Programm auf Basis der Leica-Software QWIN geschrieben, das eine automatische Steuerung von Objektiv, Lampenspannung und den XYZ-Koordinaten sowie der Bilderfassung erlaubt. Die Bilder gelangten digitalisiert über eine 3-Chip CCD Farb-TV Kamera (KY-F58, JVC, Tokio, Japan) zu einem angeschlossenen Computer und wurden dort gespeichert. Die Auflösung beträgt 760x576 Pixel. Um unterschiedlich große Algen berücksichtigen zu können, wurde jede Probe mit zwei Vergrößerungen gescannt: 20x N-Plan (n.a. 0.4; Pixelgröße 0.632 μm) und 40x N-Plan (n.a. 0.55; Pixelgröße 0.316 μm). Die Zahl der eingezogenen Bilder hing von der untersuchten Fragestellung und der Probencharakteristik ab und variierte im Allgemeinen zwischen 200 und 300 Bildern je Vergrößerung

Bildanalyse

Die Bildanalyseprogramme wurden mit der Software IDL (Research System Inc., Boulder, USA) geschrieben. Für Berechnungen, Ausgabe und Überwachung wurde eine grafische Benutzeroberfläche (Graphical User Interface, GUI) entwickelt. Nach Bildverbesserung (Farb- und Shadingkorrektur, Zurückweisung schlechter, z.B. unscharfer oder zu dunkler Bilder [6]) wurden die Bilder segmentiert. Dazu wurden mit Helligkeits- und Größeneigenschaften Objekte in den Bildern identifiziert. Für diese wurde ein Satz von quantitativer Merkmale von zur taxonomischen Bestimmung der Algen relevanten Eigenschaften ermittelt. Dabei wurde auf morphologische Kriterien (z.B. maximale Länge, Durchmesser von maximaler Innenkreis und minimalem Außenkreis, Länge und Breite der Best-fit Ellipse) und, weniger, auf Kriterien der optischen Dichte zurückgegriffen (Fig. 1). Weitere Kriterien sowie Beispielsätze für bestimmte Taxa finden sich bei Rodenacker et al. [6]. Mit Hilfe dieser Eigenschaften konnten die in der Segmentation gefundenen Objekte zugeordnet werden. Dabei wurde ein hierarchisch aufgebautes Klassifikationssystem verwendet.

Ergebnisse

Vergleiche der automatisiert verarbeiteten Proben mit manuell am Mikroskop ausgezählten Referenzen zeigen eine hohe Taxaspezifität der Qualität der Ergebnisse. (Fig. 2). Während für größere Algenarten der Fehler klein und relativ konstant ist, steigt mit abnehmender Zellgröße der Algen sowohl die Fehlerrate als auch Variabilität des Fehlers zwischen verschiedenen Proben. Je häufiger eine Art, desto kleiner ist i.A. der Fehler. Fig. 2 zeigt zwei Hauptfehler: bei hohen Zelldichten in den Referenzzählung neigt die automatische Bildanalyse zur Unterschätzung. Grund hierfür ist in erster Linie das Problem sich überlagernder Objekte, die per Bildanalyse kaum zu trennen sind. Als Gegenmaßnahme muss bei der Probenaufbereitung auf eine geeignete Zelldichte in der Planktonkammer geachtet werden, z.B. indem das bei der Sedimentierung verwendete Probenvolumen angepasst wird. Bei niedrigen Zelldichten dagegen überschätzt die Bildanalyse. Auch wenn wenig oder gar keine Zellen einer Art in einer Probe vorhanden sind, ordnet die Bildanalyse dieser Art Objekte zu. Hauptgrund dafür sind Nichtalgen-Objekte (z.B. Detritus, anderes Plankton), die zufällig den gewählten Kriterien entsprechen. Um diesem Problem zu begegnen, wurde das Verfahren weiterentwickelt.

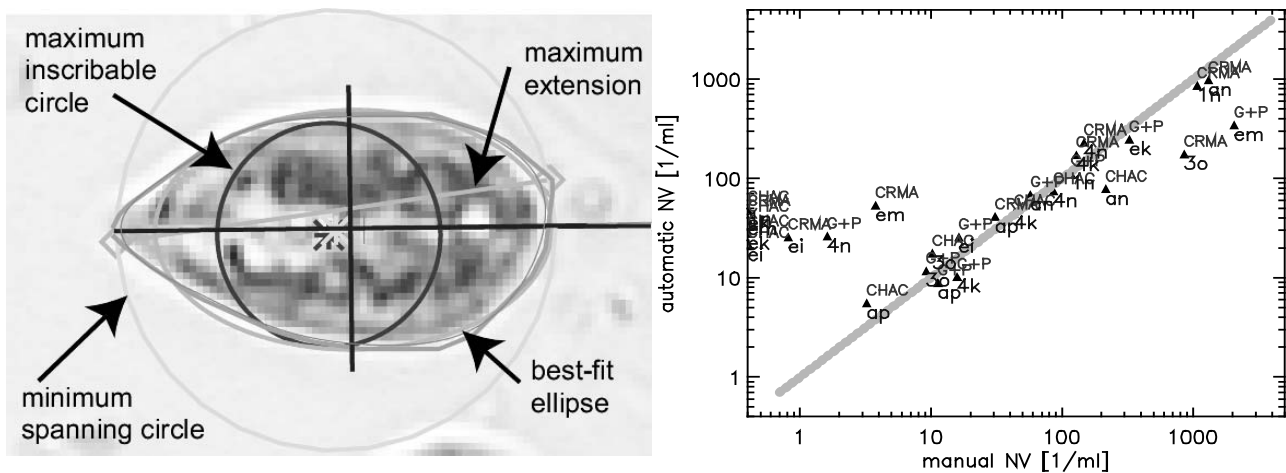


Fig. 1.: Links: Klassifikationskriterien einer Alge (*Cryptomonas marsonii*) in einer mit Lugol'scher Lösung fixierten Probe. Rechts: Vergleich der Zelldichten von manueller (manual NV) und automatisierter (automatic NV) Zählung. Unterschiedliche Abkürzungen repräsentieren Arten. Da verschiedene Proben ausgewertet wurden, treten einzelne Arten mehrfach auf. Die Linie markiert den identische Auszählungsergebnisse

Analyse von Phytoplankton-Proben unter Verwendung von Fluoreszenz

Fixierung mit Lugol'scher Lösung ist geeignet, Algenarten identifizierbar zu konservieren. Sie besitzt jedoch für die Bildanalyse einige Nachteile. Die Algen bekommen eine einheitliche bräunliche Farbe (abgesehen von violett gefärbter Stärke), die die Verwendung von Farbkriterien verhindert und von optischen Dichtekriterien erschwert. Des Weiteren vernichtet sie die Autofluoreszenz von Pigmenten aus dem Photosynthese-Metabolismus. Chlorophyll a weißt eine charakteristische Autofluoreszenz (Anregungsmaximum etwa zwischen 430 und 490 nm, Emission über 660 nm) auf, die es ermöglicht, zwischen Chlorophyll a-haltigen Algen und sonstigen (v.a. Detritus-) Partikeln zu unterscheiden [2, 7]. Des weiteren kann mittels Phycoerythrin- (PE-) Autofluoreszenz eine taxonomische Vorklassifizierung vorgenommen werden. PE-haltige Algen gehören zu den Cryptophyceen und Cyanophyceen (sowie den im Süßwasserplankton nicht relevanten Rhodophyceae) [2]. PE besitzt ein Anregungsmaximum über 500 nm und emittiert um 580–590 nm.

Probenaufbereitung

Die Probenaufbereitung entspricht der Utermöhl-Methode, außer dass als Fixierungsmittel 0.1% Glutaraldehyd verwendet wurde.

Bildeinzug

Abweichend von der bei der Fixierung mit Lugol'scher Lösung beschriebenen Vorgehensweise wurde von jeder Position direkt nach dem Hellfeldbild zusätzlich Epifluoreszenzbilder eingezogen. Dabei kamen zwei Fluoreszenzfiltersätze zur Anwendung (Leica, Bensheim, Deutschland):

1. Filtersatz I3: Anregungsfilter BP 450-490, dichroischer Reflektor 510, Emissionsfilter LP515
2. Filtersatz N3: Anregungsfilter BP546/12, dichroischer Reflektor 565, Emissionsfilter BP600/40

Der Filtersatz I3 ermöglicht, die Chlorophyll a-Fluoreszenz abzubilden, der Filtersatz N3 bildet PE-Fluoreszenz ab. Als Lichtquelle diente eine Quecksilberdampf Lampe. Während beim Filtersatz N3 fast ausschließlich Licht im Rot-Bereich abstrahlt, wird von den Proben im Filtersatz I3 Strahlung aus zwei Wellenlängenbereichen emittiert. Neben v.a. vom Chlorophyll emittierten roten Licht findet man grünes Licht, das unspezifisch von vielen (auch Nichtalgen-)Objekten ausgestrahlt wird. Obwohl letzteres nicht algenspezifisch ist, kann es nützliche Zusatzinformationen enthalten. So kann z.B. aus dem Verhältnis von Fläche und/oder Intensität der rot- zur grünstrahlenden Fluoreszenz Information über die relative Chloroplastengröße gewonnen werden. Um Speicherplatz zu sparen, werden die beiden Fluoreszenzbilder zu einem RGB-Bild kombiniert. Dazu wird die Information aus dem Rotkanal des mit dem Filtersatz N3 erhaltenen Bildes im Blaukanal des mit Filtersatz I3 erstellten Bildes gespeichert. Die spektrale Zerlegung erfolgt durch Filter der TV-Kamera.

Bildanalyse

Es wurden jetzt zusätzlich Farbinformationen der Hellfeldbilder verwendet. Da Hellfeld- und Fluoreszenzbilder von gleichen Stellen der Proben vorhanden sind, konnte die Fluoreszenzinformation als zusätzliches objektspezifisches Klassifikationsmerkmal verwendet werden.

Ergebnisse

Fig. 2 zeigt ein Beispiel von mit Hellfeld (Fig. 2A) und dem Fluoreszenzverfahren gewonnenen Bildern einer Stelle. Das kombinierte Fluoreszenzbild wird hier getrennt nach seinen drei Farbkanälen dargestellt. Dabei zeigt Fig. 2B Chlorophyll-Fluoreszenz, Fig. 2C unspezifische grüne Fluoreszenz (beide emittiert mit Filtersatz I3) und Fig. 2D PE-Fluoreszenz (emittiert mit Filtersatz N3). Objekt 1, eine Cryptophyce, leuchtet in Fig. 2B und 2D (Chlorophyll und PE), jedoch nur schwach in Fig. 2C. Objekt 3 (Dinophyce) und 4 (Diatomee) zeigen Chlorophyll-Fluoreszenz (Fig. 2B), jedoch praktisch kein Leuchten in Fig. 2D. Die Cyanophyce (Objekt 5) leuchtet sehr stark in Fig. 2D (PE) und etwas in Fig. 2B (Chlorophyll). Objekt 2, das einen Zooplanktonorganismus zeigt, ist das hellste Objekt in Fig. 2C (unspezifische Hintergrundfluoreszenz) und leuchtet nur schwach diffus in Fig. 2B. Die sonstigen Kleinpartikel fluoreszieren fast gar nicht. Es ist also möglich, zwischen Objekten, die Chlorophyll, Chlorophyll und PE oder keines von beiden enthalten, zu unterscheiden. Das ermöglicht eine Trennung von Nichtalgenobjekten und Algen einerseits und von PE- und Nicht-PE-haltigen Algen andererseits.

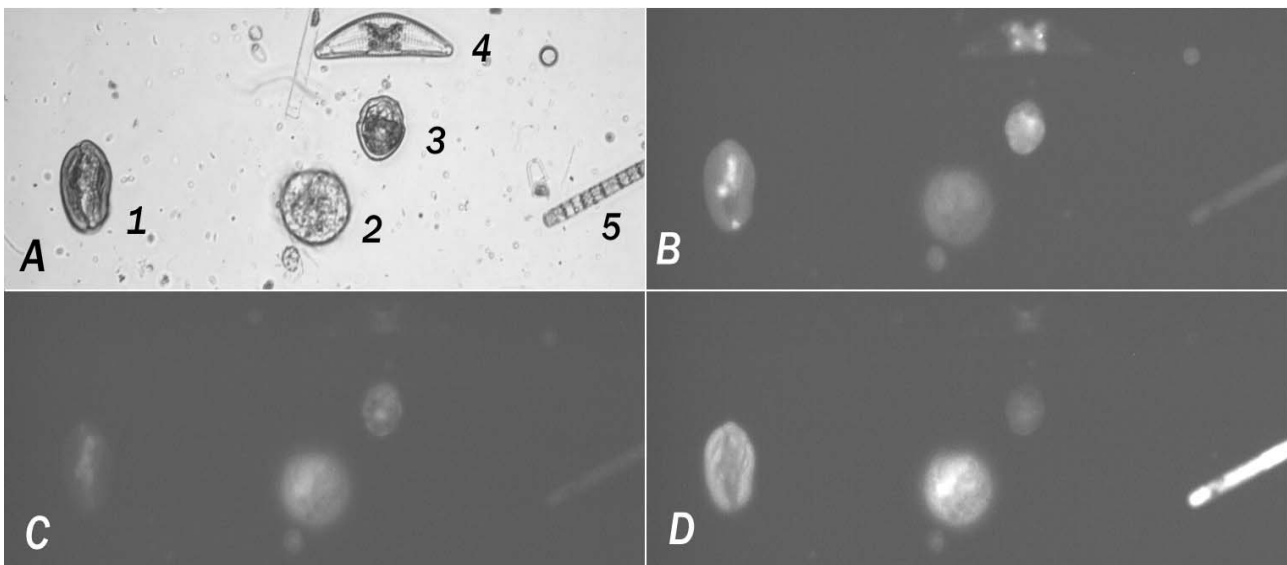


Fig. 2: Beispiel einer mit Hellfeld- und Fluoreszenztechnik gescannten Probe (40x Objektiv); A) Hellfeldbild; Objekt 1 : Cryptophyce, Obj. 2: Zooplankton, Obj. 3: Dinophyce, Obj. 4: Diatomee, Obj. 5: Cyanophyce. B) bis D) Das nach Farbkanälen aufgetrennte kombinierte Fluoreszenzbild. B) Rotintensität der Fluoreszenz mit Filtersatz I3 (Chlorophyll), C) Grünintensität der Fluoreszenz mit Filtersatz I3 (unspezifisch), D) Rotintensität der Fluoreszenz mit Filtersatz N3 (PE)

Diese Unterscheidung wird in Fig. 3 mit einer Auswahl von *Cryptomonas* sp. und *Peridinium* sp. illustriert, die nur durch I3-Rotfluoreszenz- (Chlorophyll) und N3-Rotfluoreszenzintensität getrennt werden unter Ausschluss von Partikeln mit Fläche $<300 \mu\text{m}^2$ (*Peridinium* sp.) bzw mit Länge $<19 \mu\text{m}$ (*Cryptomonas* sp.). Obwohl hier fast ausschließlich Fluoreszenzintensitätskriterien verwendet wurden, konnte eine weitgehende Identifikation erreicht werden. Zusätzliche Kriterien (z.B. Form, Größe, Farbe im Hellfeld, Dichte) werden zur weiteren Differenzierung herangezogen.

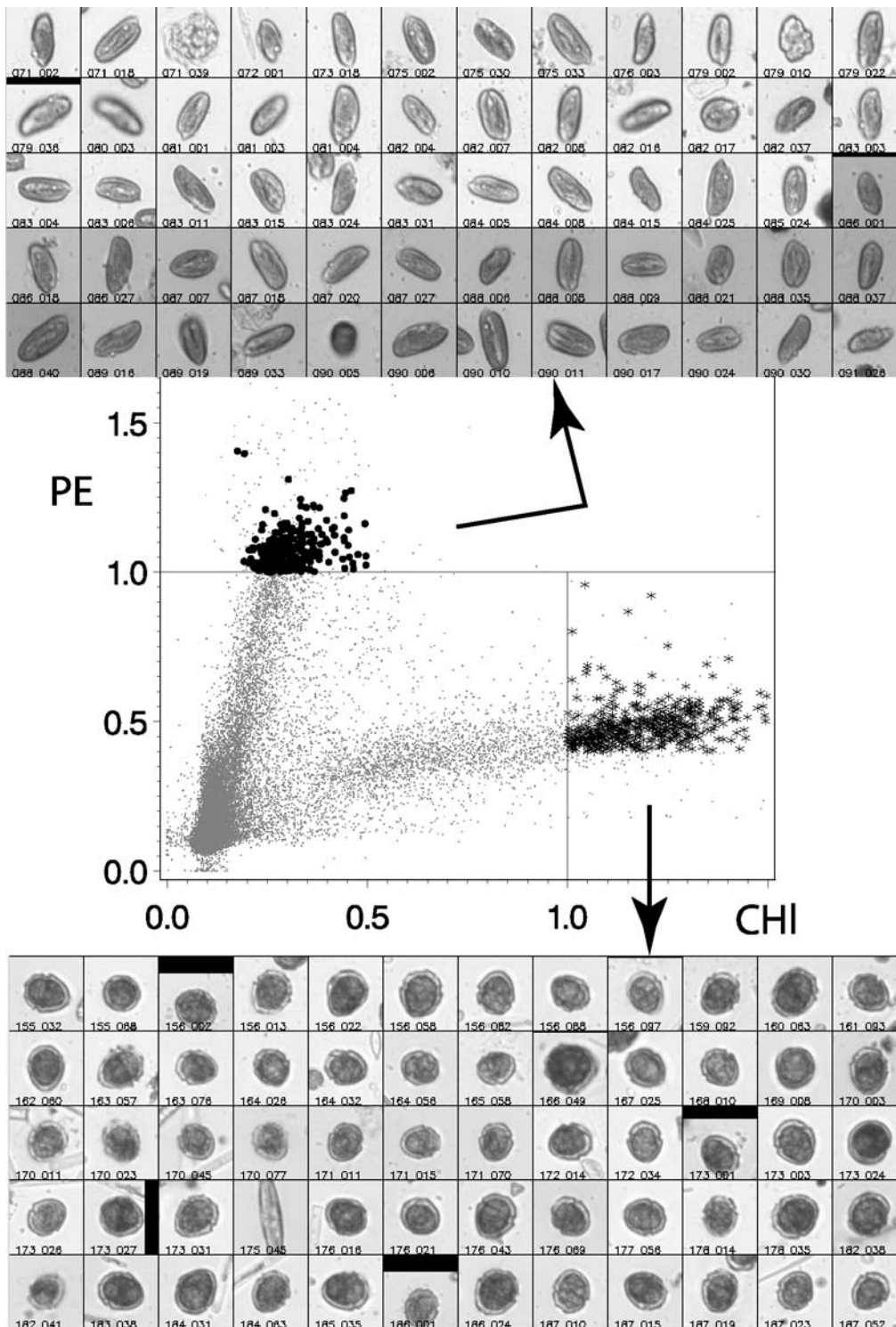


Fig. 3: Detektion von *Cryptomonas* sp. (oben) und *Peridinium* sp. (unten) durch Fluoreszenzkriterien. Mitte: Scatterplot von mittlerer I3-Rotfluoreszenz (Chlorophyll, CHI) gegen mittlerer N3-Rotfluoreszenz (PE)

Diskussion

Eine Hauptfehlerquelle bei der Identifizierung von Algen mit rein morphometrischen Bildanalyse-kriterien stellt die falsche Zuordnung von Nichtalgen-Objekten zu bestimmten Algentaxa dar, weil sie zufällig hinsichtlich der gewählten Form- und Größenkriterien diesen entsprechen. Diesem Problem, dass insbesondere bei detritusreichen Wässern relevant wird, kann durch die zusätzliche Verwendung von Chlorophyll-a-Fluoreszenz begegnet werden. Es konnte gezeigt werden, dass dadurch mit Hilfe der Bildanalyse eine Vortrennung von Algen und Nichtalgen-Objekten möglich ist. Die zusätzliche Verwendung eines entsprechenden Fluoreszenzfiltersatzes ermöglicht es zudem,

PE-haltige Algen zu identifizieren und damit eine taxonomische Trennung zu erreichen. Zusammen mit der Einbeziehung von Farbinformationen, die durch die Verwendung der Glutaraldehydfixierung möglich wird, können so Bildobjekte den Algentaxa zugeordnet werden.

Dabei sind einige Aspekte zu beachten. Die Fluoreszenz ermöglicht keine einfache Ja/Nein-Trennung (z.B.: Leuchten im Filtersatz N3 bedeutet PE ist vorhanden und damit Objekt ist eine Cryptophyceae oder Cyanophyceae). Statt dessen muss mit Hilfe von geeigneten Intensitätsschwellen und dem Vergleich verschiedener Fluoreszenzen ermittelt werden, ab wann von dem Vorhandensein von bestimmten Pigmenten ausgegangen werden kann. Dabei müssen Kriterien wie Alter und Aufbereitung der Probe beachtet werden. Um die Pigment-Fluoreszenz zu erhalten, sollten die Proben kühl und dunkel gelagert werden. Eine Identifizierung von Algen mit Hilfe der Fluoreszenz ist selbstverständlich nur möglich bei Zellen, die aktive Pigmente enthalten. Tote Zellen mit degeneriertem Pigmenten werden ebenso wenig erfasst wie solche ohne Chloroplasten.

Die hier vorgestellte Methode ermöglicht eine weitgehend automatische Bearbeitung von Phytoplanktonproben. Nachdem zu Beginn die gewünschten Einstellungen z.B. hinsichtlich Vergrößerungen, Fluoreszenzfilter, Abtastweg, Bildzahl usw. eingegeben wurde, läuft die Bildakquirierung automatisch. Gleiches gilt für die Bildanalyse. Die Hauptbereiche ohne Automatisierung liegen bei Festlegung von Kriterien für die Beschreibung bestimmter Arten und bei Kontrollen, ob die Festlegungen zu den erwünschten Ergebnissen führen.

Die Methode vermindert den erforderlichen menschlichen Arbeitsaufwand. Zudem ist eine Qualitätskontrolle einfacher als bei manueller Auswertung. Der zeitliche Aufwand zur Abtastung einer Planktonkammer beträgt derzeit etwa 4-5 Stunden pro Vergrößerung, davon 10-15 Minuten menschliche Arbeitszeit. Das Material kann in Form von digitalen Bilddaten unbegrenzt archiviert werden, und steht damit später sowohl für Kontrollen als auch für neue Fragestellungen zur Verfügung. Die ausgewertete Probenfläche ist dabei fast beliebig an die Fragestellung anzupassen, nur begrenzt vom Speicherplatz und der an den Geräten zu Verfügung stehenden Zeit. Die Zahl der ausgewerteten Objekte wird nicht durch die Kapazität des Bearbeiters beschränkt. Neben der Aufklärung der Phytoplanktonstruktur können weitere Fragestellungen, z.B. zu Populationsschwankungen (z.B. toxischer) bestimmter Arten oder Veränderungen von Größenkriterien bearbeitet werden. Aus den Größenangaben kann über Volumenberechnungen auf die Biomasse der Algen rückgeschlossen werden. Ein weiterer Vorteile möglicher Anwendungen ist, kleine Objekte, bei denen bei Hellfeldbetrachtung oft unklar ist, ob es sich um Algen handelt, durch vorhandene Fluoreszenz als solche zu identifizieren. Bei Unklarheit, ob z.B. ein Flagellat autotroph ist, kann das Vorhandensein von Chlorophyll-Fluoreszenz Aufschluss geben. Prinzipiell ist (fast) die gleiche taxonomische Auflösung wie bei manueller Bearbeitung möglich. Allerdings steigt der Aufwand, bei sehr artenreichen Proben eindeutig alle Taxa zu identifizieren, überproportional an.

Da der Hauptaufwand manueller Arbeit bei der Implementierung der Klassifikatoren für neue Arten entsteht, ist die Methode ist v.a. dann geeignet, wenn längerfristige Untersuchungen an Gewässern erfolgen, in denen untersuchte Arten immer wieder auftreten.

Danksagung: Wir danken dem Institut für Ökologische Chemie (GSF), insbesondere Herrn Dr. Schramm, Frau Dr. Severin und Herrn Jaser für die Bereitstellung von Phytoplanktonproben.

Literatur

1. Utermoehl H. 1958. Mitt Int Ver Theor Angew Limnol 9:1-38
2. Schäfer H, Siedler M, Beisker W, Müller K, Steinberg EW. 1995. Vom Wasser, 84:379-389.
3. Franqueira D, Orosa M, Torres E, Herrero C, Cid A. 2000. Sci Total Environ; 247:119-126
4. Hense BA, Jüttner I, Welzl G, Severin GF, Pfister G, Behechti A, Schramm K-W; 2003. Environ Toxicol Chem 22:2727-2732
5. Hense BA, Severin GF, Welzl G, Schramm K-W. (accepted). Effects of 17 α -ethinylestradiol on zoo- and phytoplankton in lentic microcosms; J Anal Bioanal Chem
6. Rodenacker K, Gais P, Jütting U, Hense BA. 2002. In: Schramm K-W, Severin GF. Statusreport; GSF-Bericht 02/02, Neuherberg (München), Deutschland, 2002; Seite 16-24
7. Babichenko S, Kaitala S, Leeben A, Poryvkina L, Seppälä J. 1999. J Marine Systems, 23:69-82