

Elektrooptische *on line* Bestimmung der Zellvitalität in Biogasprozessen





Motivation

- Während die prozesstechnischen Schritte innerhalb der industriellen Biogasproduktion vergleichsweise gut untersucht sind, ist wenig über den physiologischen Zustand der Mikroorganismen unter Produktionsbedingungen bekannt.
 - Veränderungen/Störungen im Prozess finden aber zuerst in der Zelle statt, bevor Auswirkungen in den Prozessparametern sichtbar werden.
 - Dies ist umso bedeutender, wenn die Fahrweise einer Anlage flexibel hinsichtlich der Substratzusammensetzung und –menge sein soll.
- **Eine Bewertung des physiologischen Zustands der Zellen kann wertvolle Hinweise zur Identifizierung geeigneter, stabiler Betriebspunkte liefern.**



Motivation

Es ist bisher keine Methode verfügbar, die *on line* die Vitalität von Zellen bewerten kann.

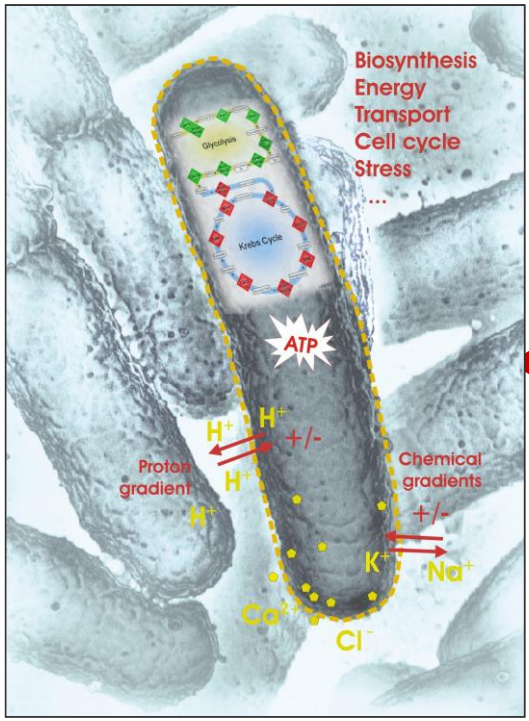
Ist die Methode der elektrooptischen Messung der induzierbaren Polarisierbarkeit von Zellen dazu geeignet?

Quantifizierung des Transmembranpotentials länglicher Zellen bei unterschiedlichen Frequenzen

Bestimmung ohne Färbemethoden, damit die Probe schnell und automatisiert untersucht werden kann

Die Methode liefert einen Durchschnittswert aller betrachtbaren Zellen

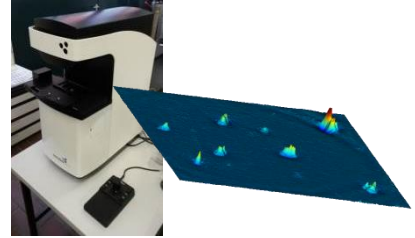
Messmethoden Zellphysiologie



Fluoreszenzzytometrie



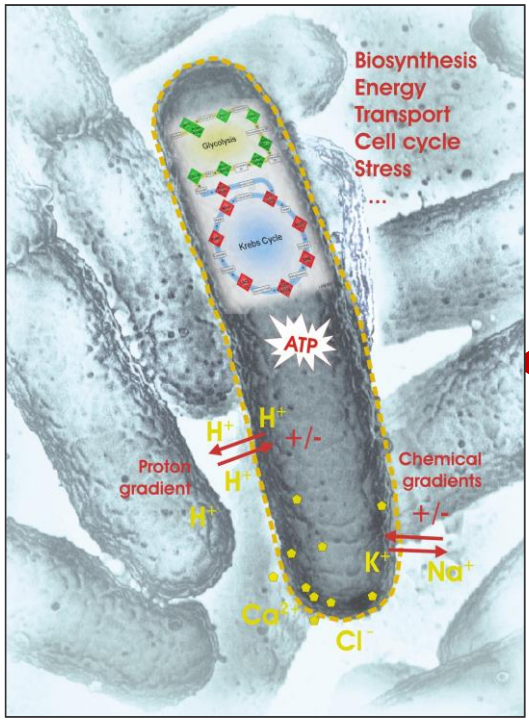
3-D Holographie-Mikroskopie



Elektro-optische Messung



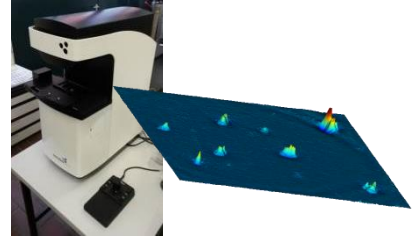
Messmethoden Zellphysiologie



Fluoreszenzzytometrie



3-D Holographie-Mikroskopie



Elektro-optische Messung



Flusszytometrie - Probenvorbehandlung

Probenaufarbeitung für die Durchflusszytometrie von Biogasproben

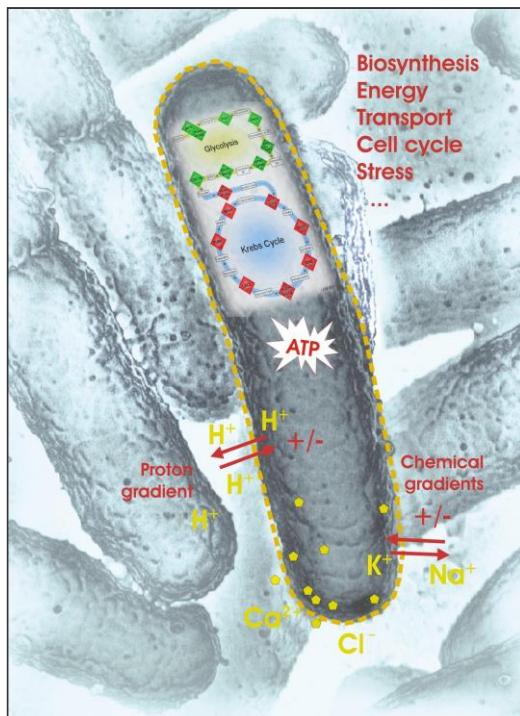
Fixation	Detergenzien	Konz.	Homogenisierung			Zentrifugation			
Formaldehyd 3,7% /EtOH 50%	BaCl ₂	5 mM	Ultraschall	<i>Leistung</i>	<i>Dauer</i>	<i>Impulse/s</i>	<i>G-Zahl</i>	<i>Dauer</i>	<i>Phase</i>
Paraformaldehyd 2%	Bromhexinhydrochlorid	0,2 %		40-65W	60s	5	3200g	10min	Pellet
	Natrium Azid	10%		15-35W	30s	5	8000g	20min	Pellet
	Natrium Hexametaphosphat	0,2-0,5 %	Vortex		10s		650g	2min	Überst.
	Natrium Pyrophosphat	0,2%							
	NiCl ₂	5-15 mM							
	Triton X-100	10-20 µg/L							
	Tween	5-25 µg/L							
	Tween 20	0,41 mM							
	Tween 21	4,1 mM							
	Tween+Flokkulationsreagenz	25 µg/L							
	Zitronensäure	0,11 M							

Referenz: Nettmann (ATB); Günther, Koch (UFZ)

Vorteil: Im Bereich der mikrobiellen Reinkultur bereits etablierte Methode.

Nachteil: Großer Anteil händischer Probenvorbereitung - können da Einflüsse der Probenbehandlung noch quantifiziert werden?

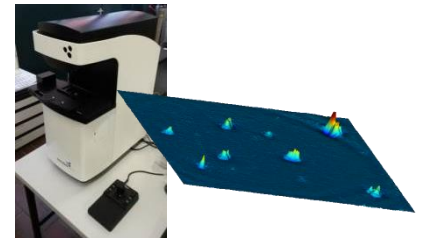
Messmethoden Zellphysiologie



Fluoreszenzzytometrie



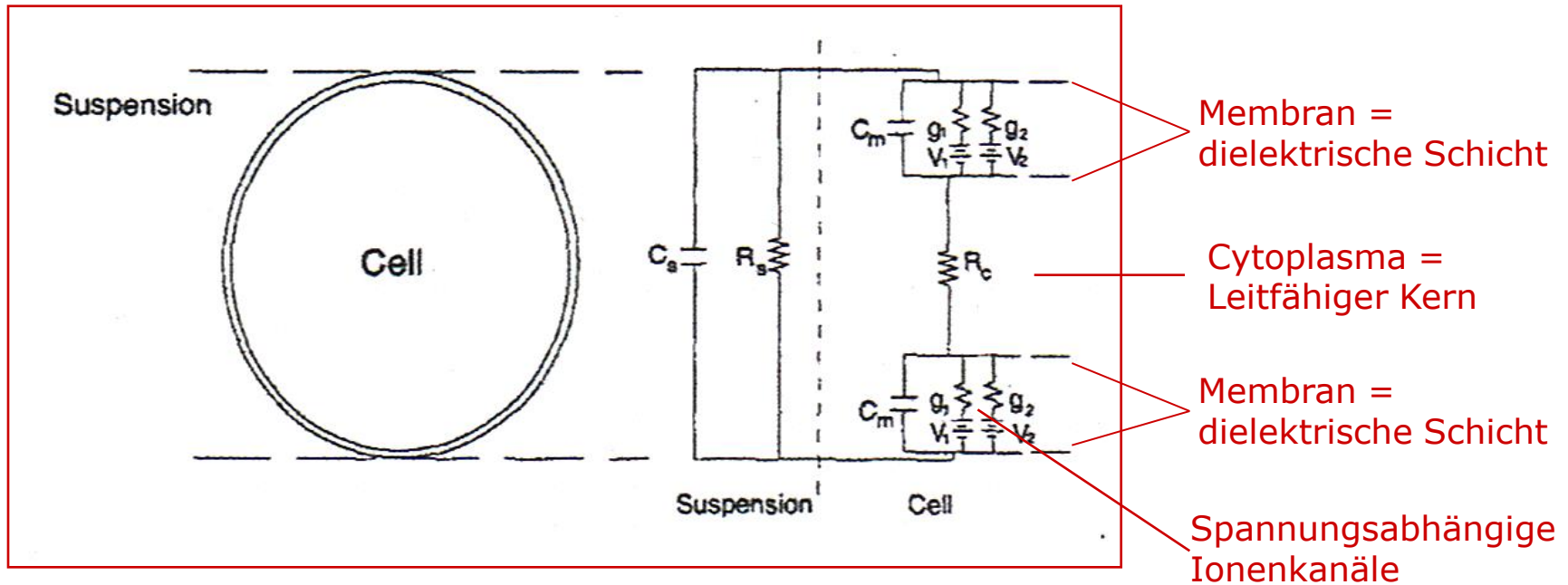
3-D
Holographie-
Mikroskopie



Elektro-
optische
Messung



Polarisierbarkeit – Hintergrund



- Anwendungen: Elektroporation, Dekontamination, Biofouling-Vorbeugung

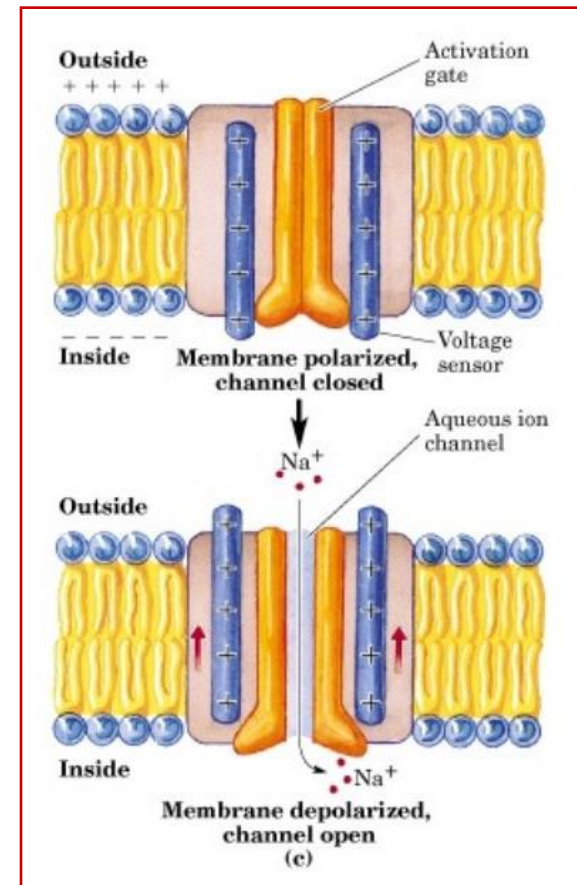
Polarisierbarkeit –

Einfluss elektrischer Felder auf mikrobielle Membranen

- Werden Mikroorganismen einem elektrischen Feld ausgesetzt, ändert sich das Transmembranpotential
- Wenn Mikroorganismen elektrischen Impulsen im Bereich kleiner Wellenlängen ausgesetzt sind, wird dadurch die Spannung an der äußeren Seite der Ionenkanäle beeinflusst.

Elektrisches Ungleichgewicht an der Zellaußenseite

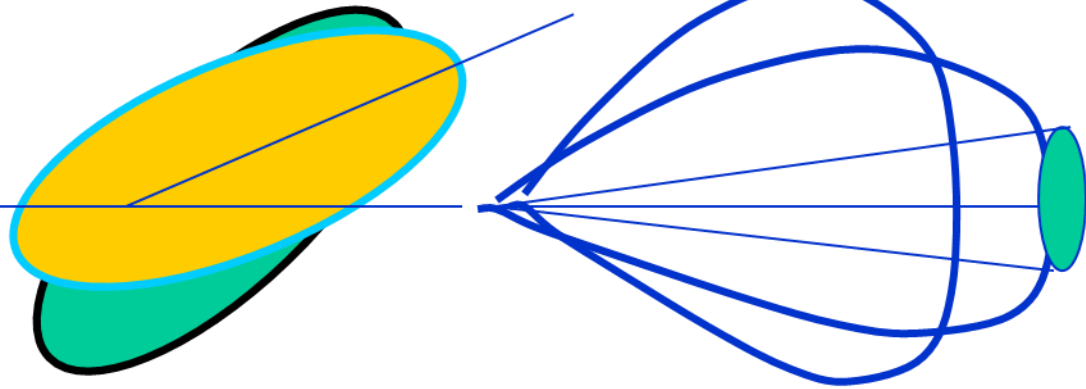
- Metabolische Aktivität hängt u.A. von den Transportprozessen durch die Membran ab



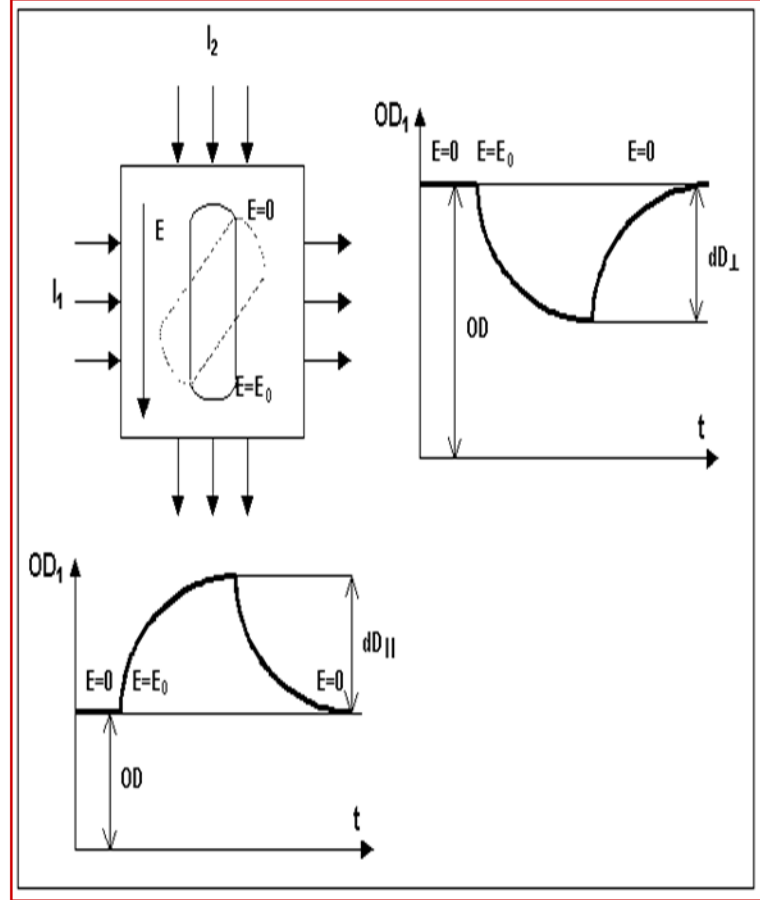
Quelle: <http://courses.cm.utexas.edu>

Polarisierbarkeit – Hintergrund

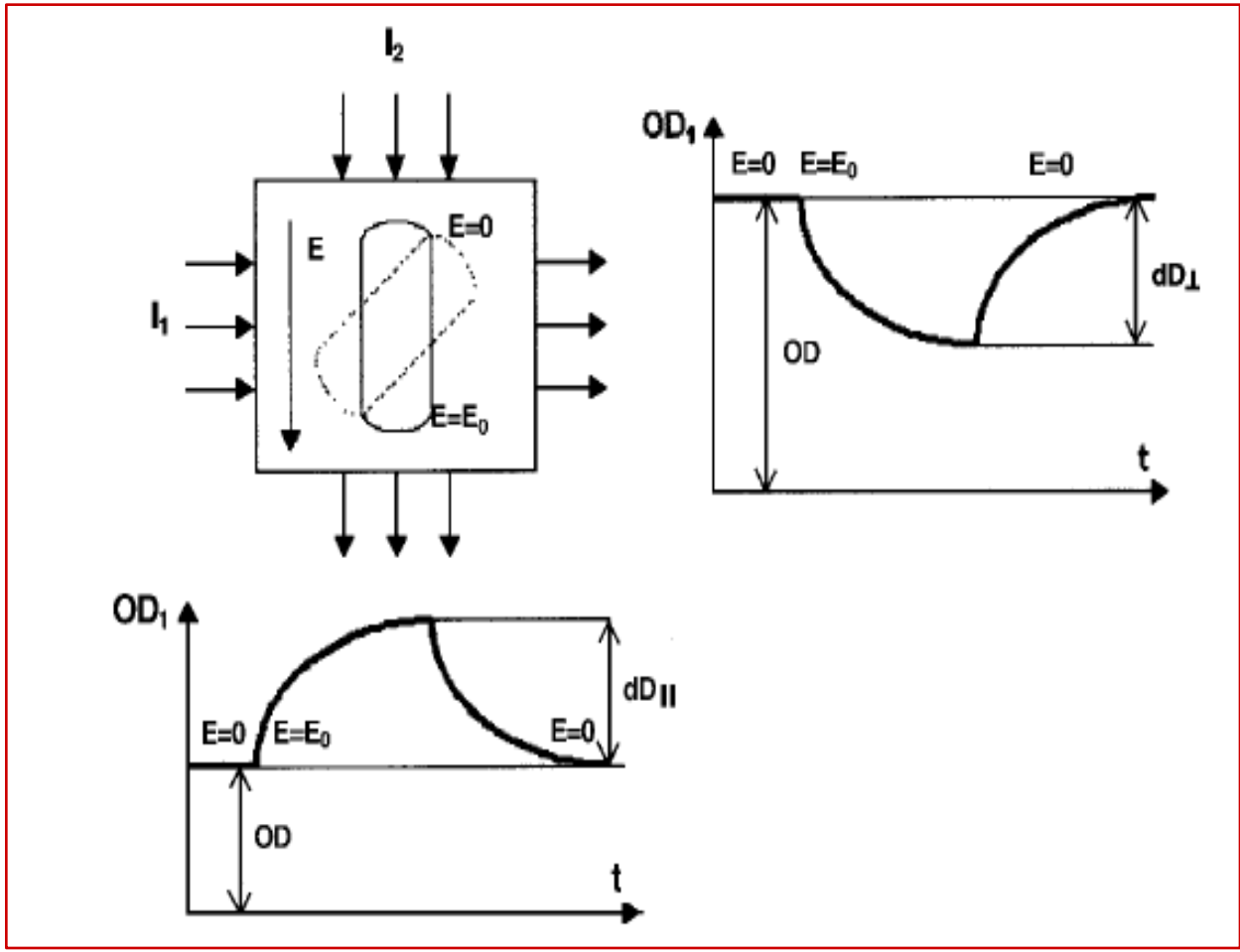
Lichtstrahl



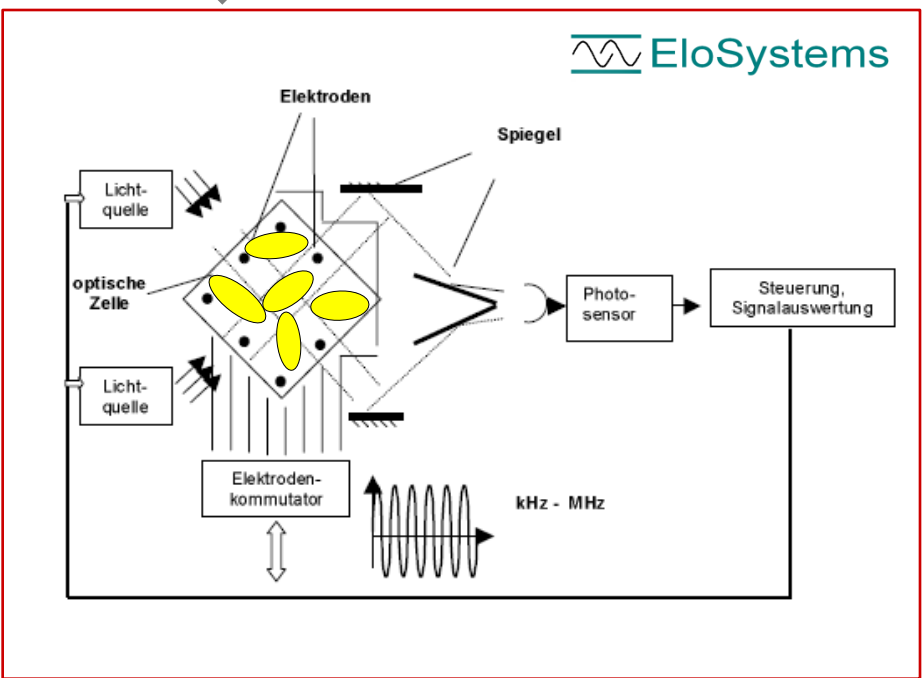
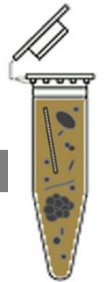
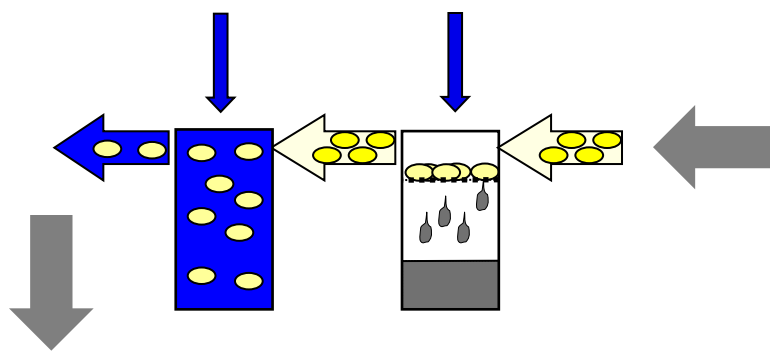
Änderung der Exkttinktion



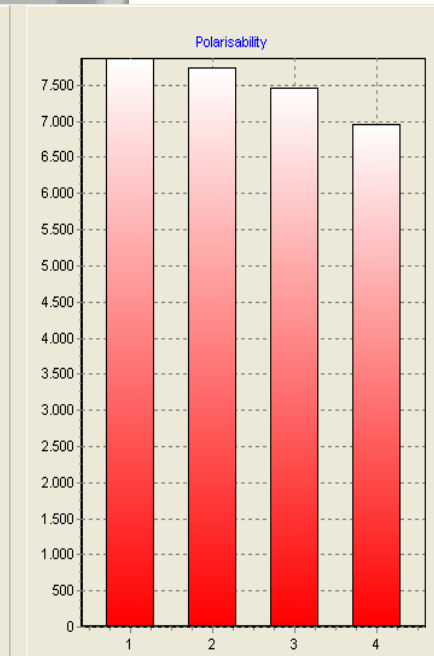
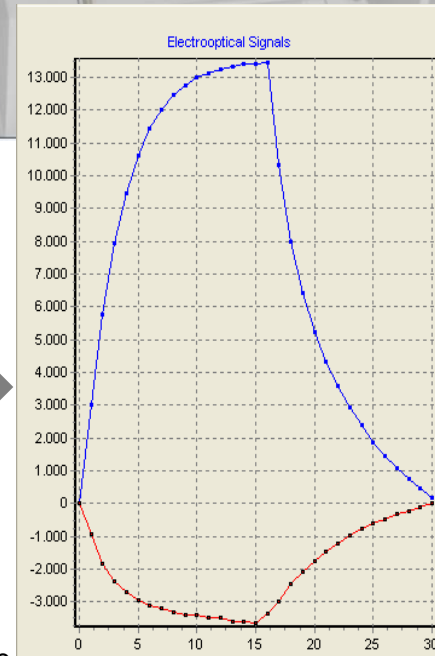
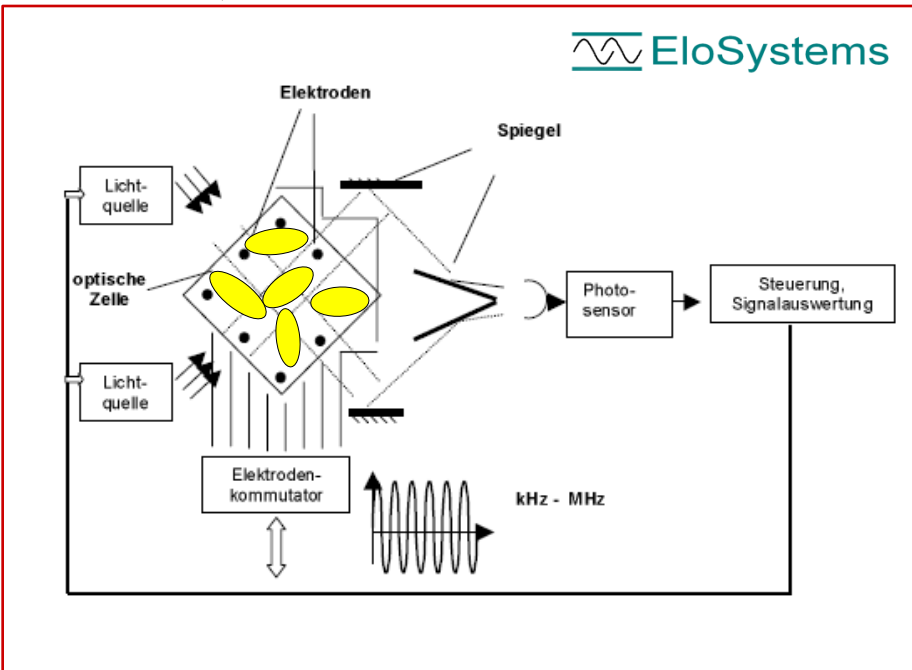
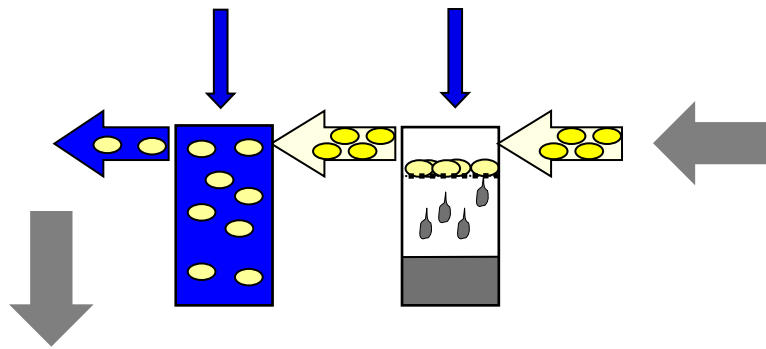
Polarisierbarkeit – Hintergrund



Elektrooptische Messung – EloTrace

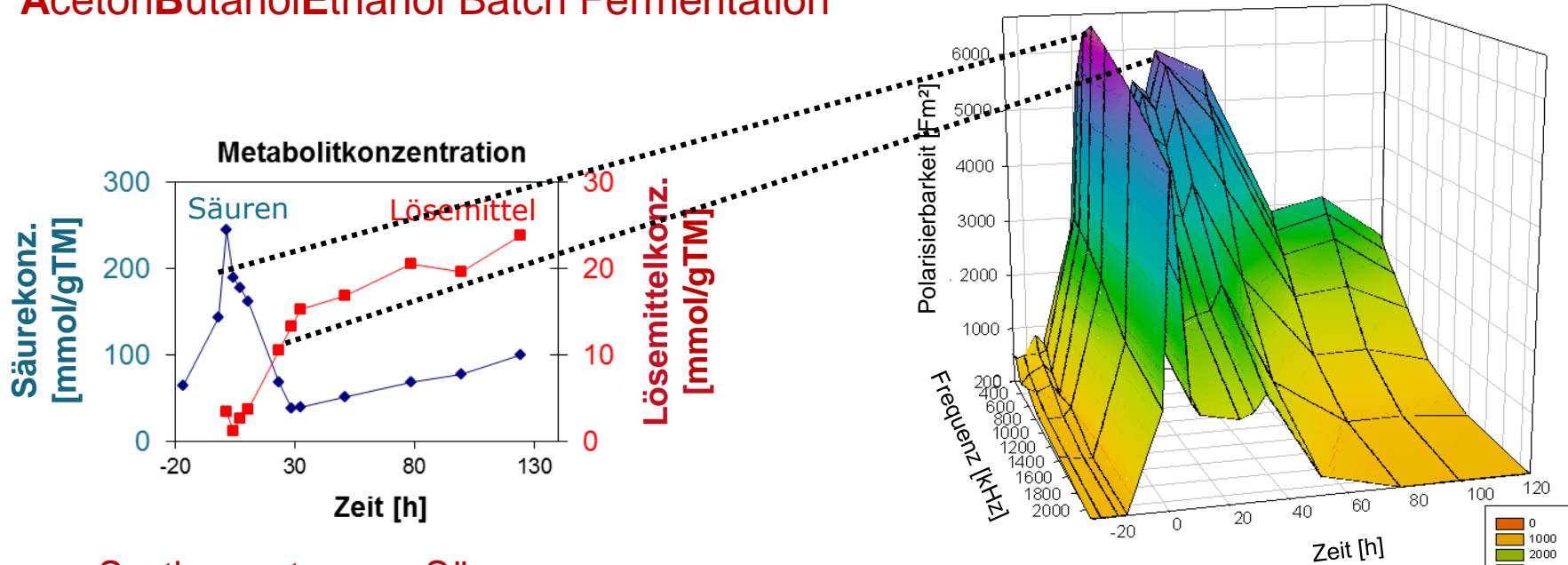


Elektrooptische Messung – EloTrace



Elektrooptische Messung – *Clostridium acetobutylicum*

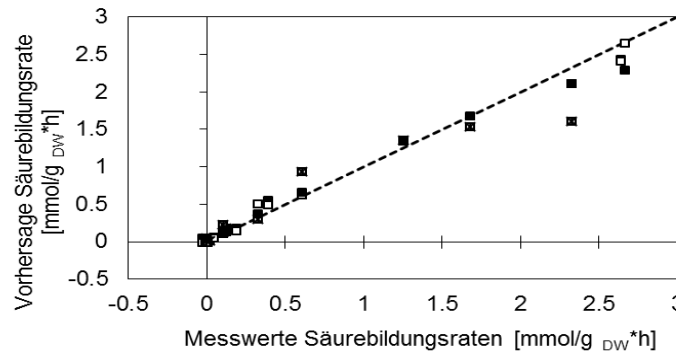
AcetonButanolEthanol Batch Fermentation



Syntheseraten von Säuren können mit der Methodik abgeleitet werden



Maß für die Stoffwechselaktivität



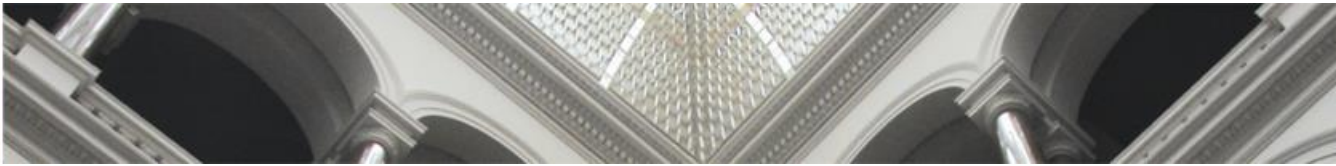
Junne et al, Biotechnology and Bioengineering, 2008



Messung der Polarisierbarkeit – Herausforderungen

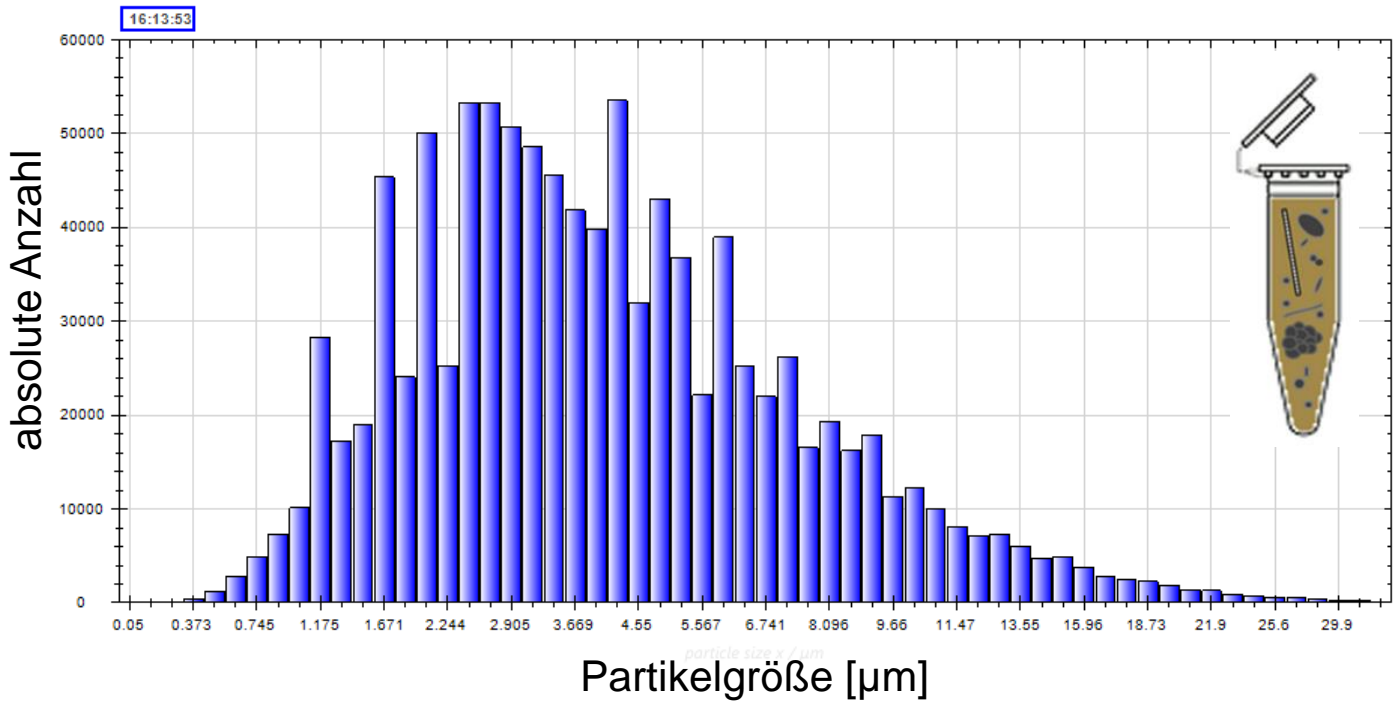
bei der Messung in Biogasprobenmatrizes:

- Fasern und grobe Partikel müssen aussortiert werden
- Repräsentation der mikrobiellen Zusammensetzung dann noch gegeben?
- Wie hoch ist die Reproduzierbarkeit der Messungen bei der halbautomatischen Probenvorbehandlung?
- Nur ein Teil der Mikroorganismen werden gemessen – sind aufgrund dieser Daten relevante Rückschlüsse auf den Prozess möglich?



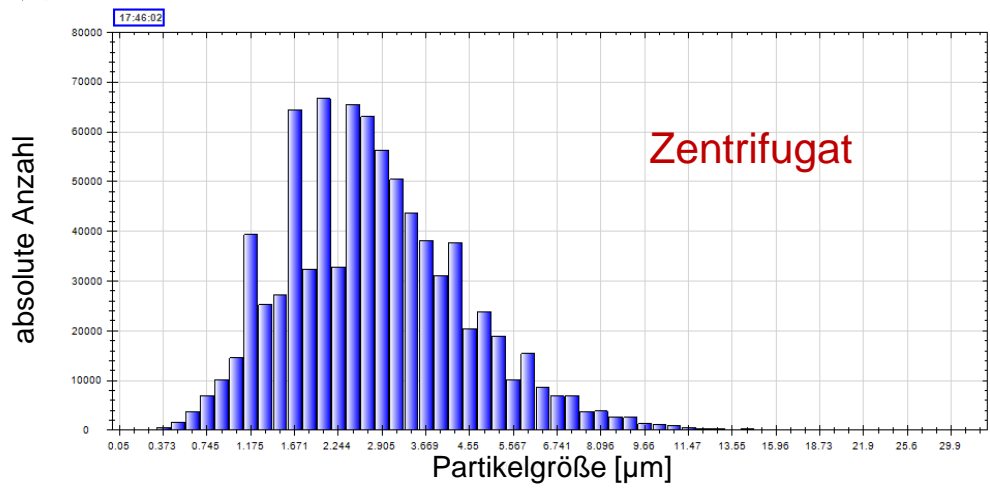
Probenvorbereitung – Messung der Partikelgröße zur Optimierung

Ziel: Separation von lebenden Zellen und restlichem biogenen Material
 Partikelgröße in Biogasproben gemessen mit Laserlicht-Rückreflexion
 (BioCell Analyzer, S+E Sequip GmbH)



➤ **Filtrat nach Filtrierung mit 45 μm -Membranfilter**

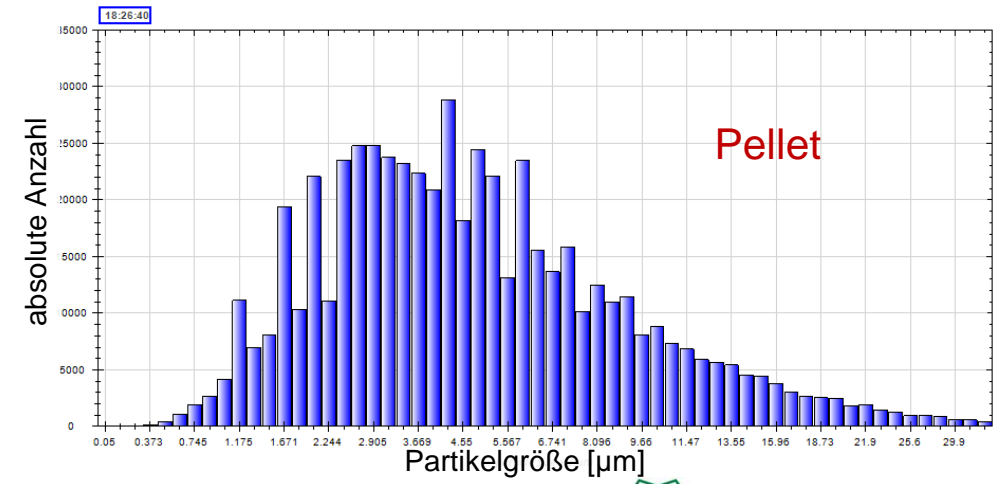
Probenvorbereitung – für elektrooptische Messungen



➤ Zentrifugation 500xg entfernt Partikel >10 µm

Relevante Partikelgröße für die Messung von Bakterienzellen

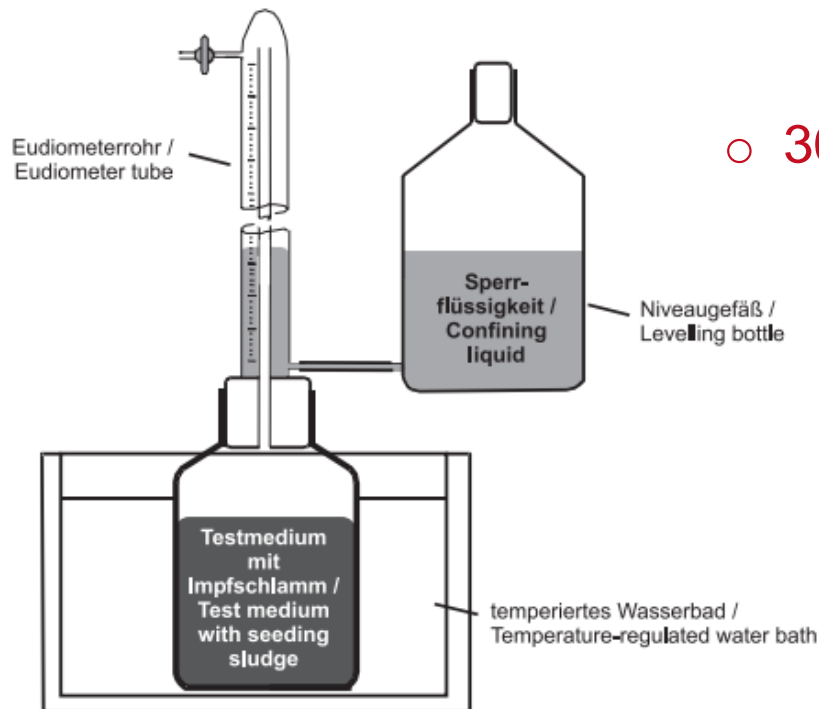
Herausforderung:
Integration in die halbautomatische Probenvorbereitung.



Zellstatus-Monitoring

○ Batch-Vergärung über 30 Tage

nach VDI-Richtlinie: VDI 4630 Vergärung organischer Stoffe



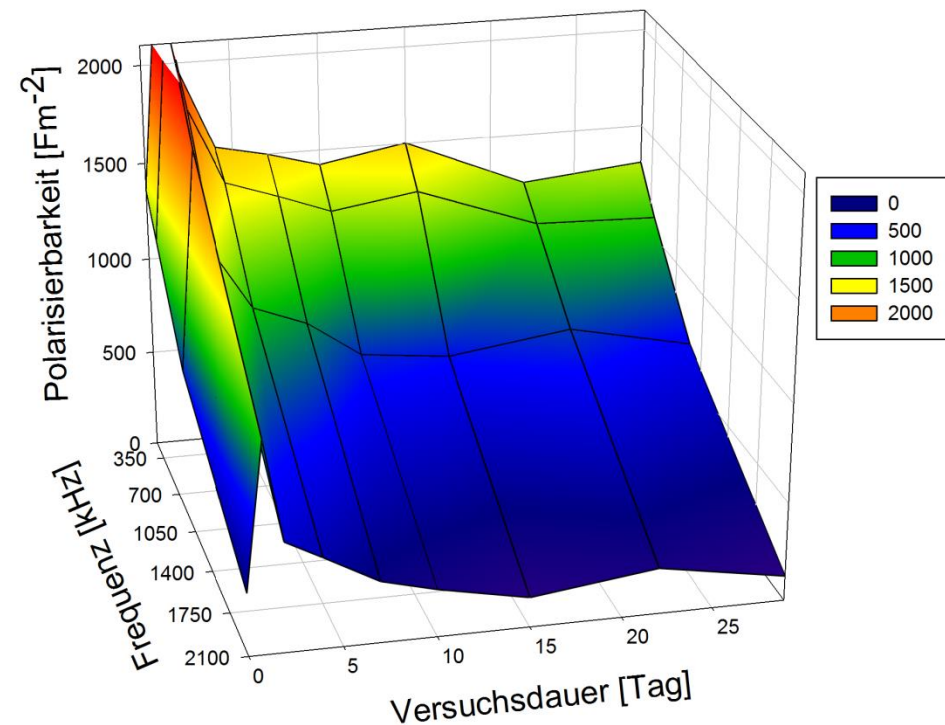
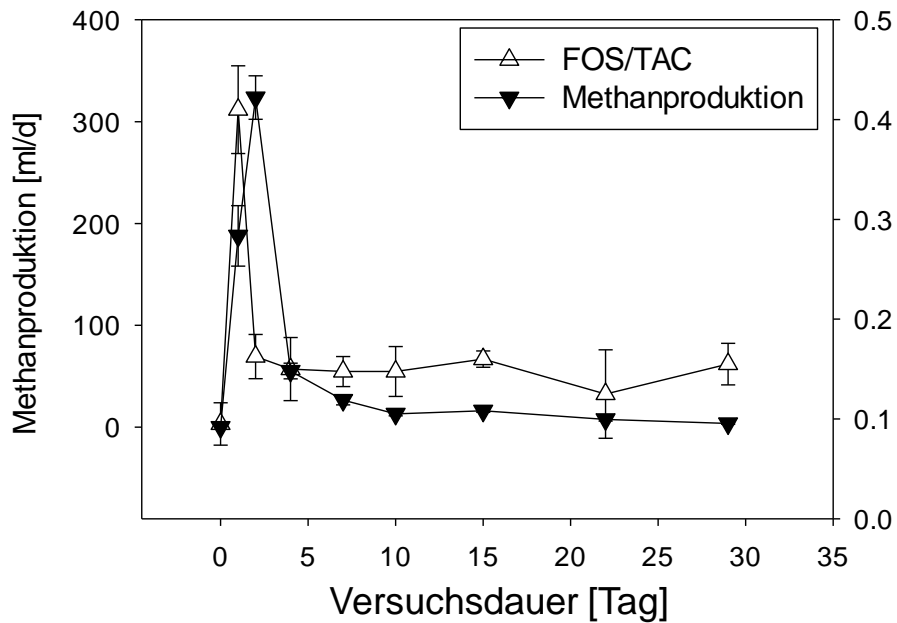
○ 300g Inokulum + 2g Maisstärke

- Batch 1: Inokulum: Klärschlamm
- Batch 2: Inokulum: NaWaRo-Anlage

Versuchsapparatur nach DIN 38414-8, Quelle VDI Richtlinie VDI 4639

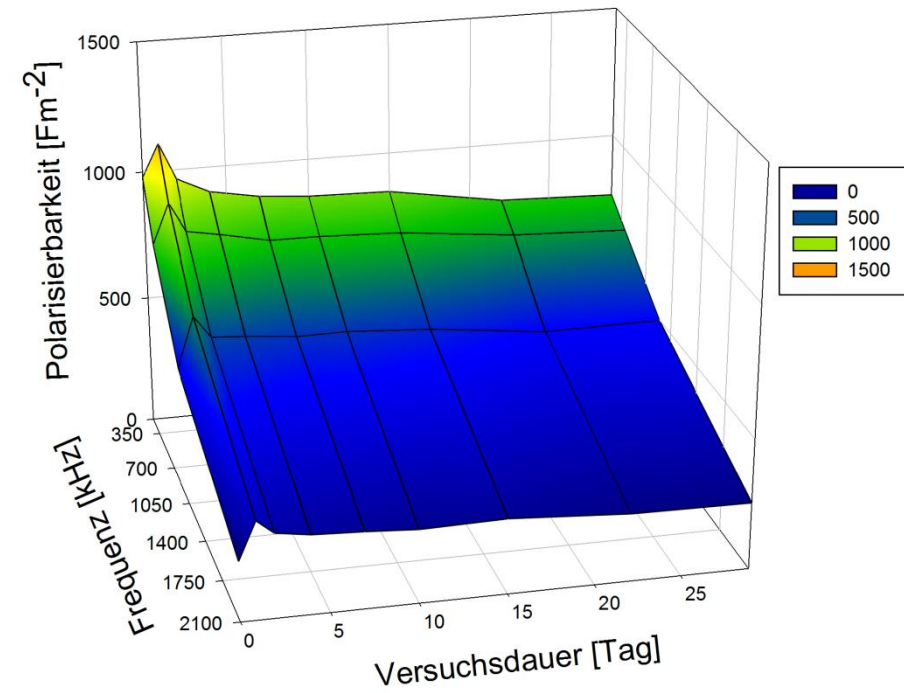
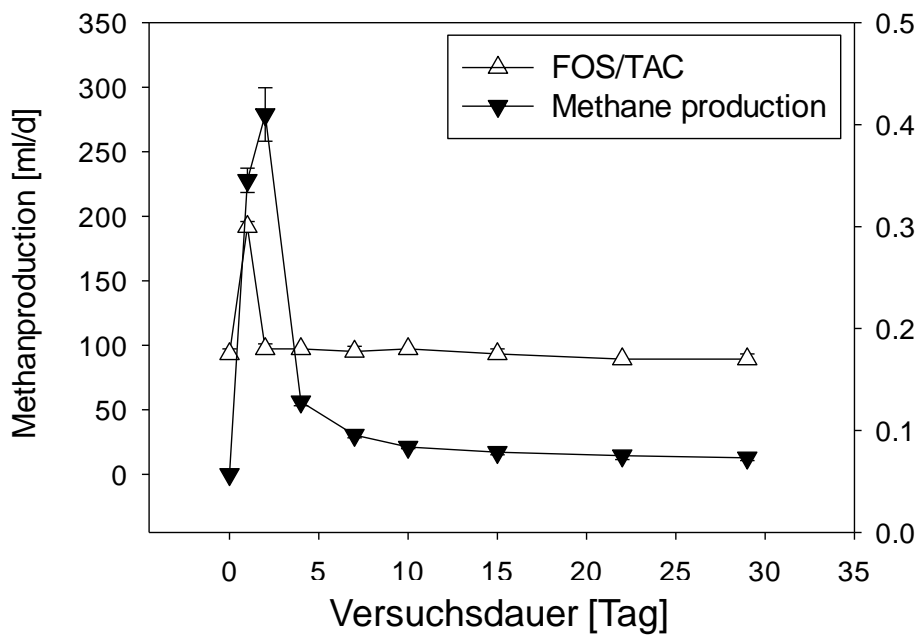
Zellstatus-Monitoring – Batch-Versuche

Inokulum: **Klärschlamm**



Zellstatus-Monitoring – Batch-Versuche

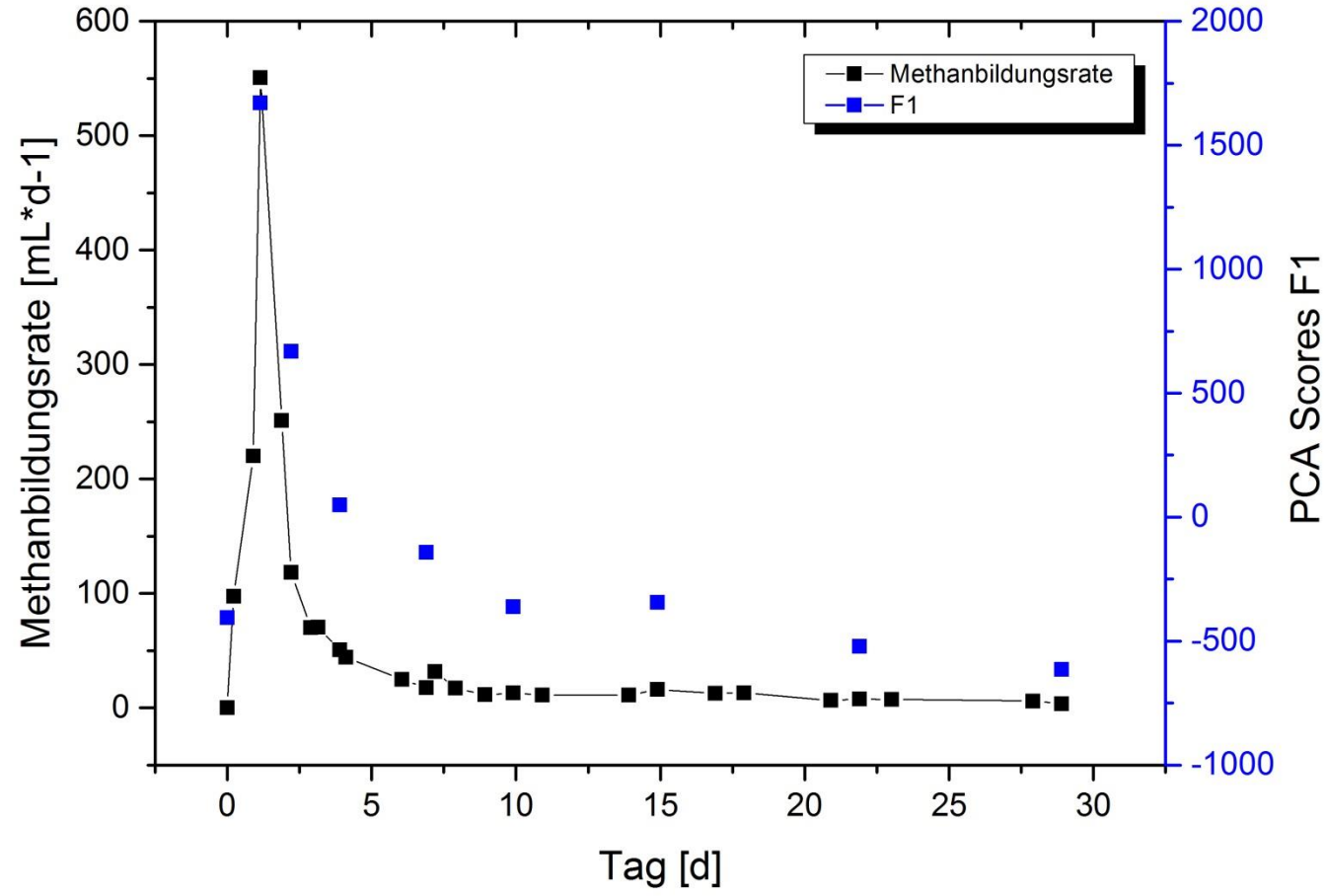
Inokulum: NaWaRo-Anlage



Zellstatus-Monitoring –

Zusammenhang Methanbildungsrate und Polarisierbarkeit

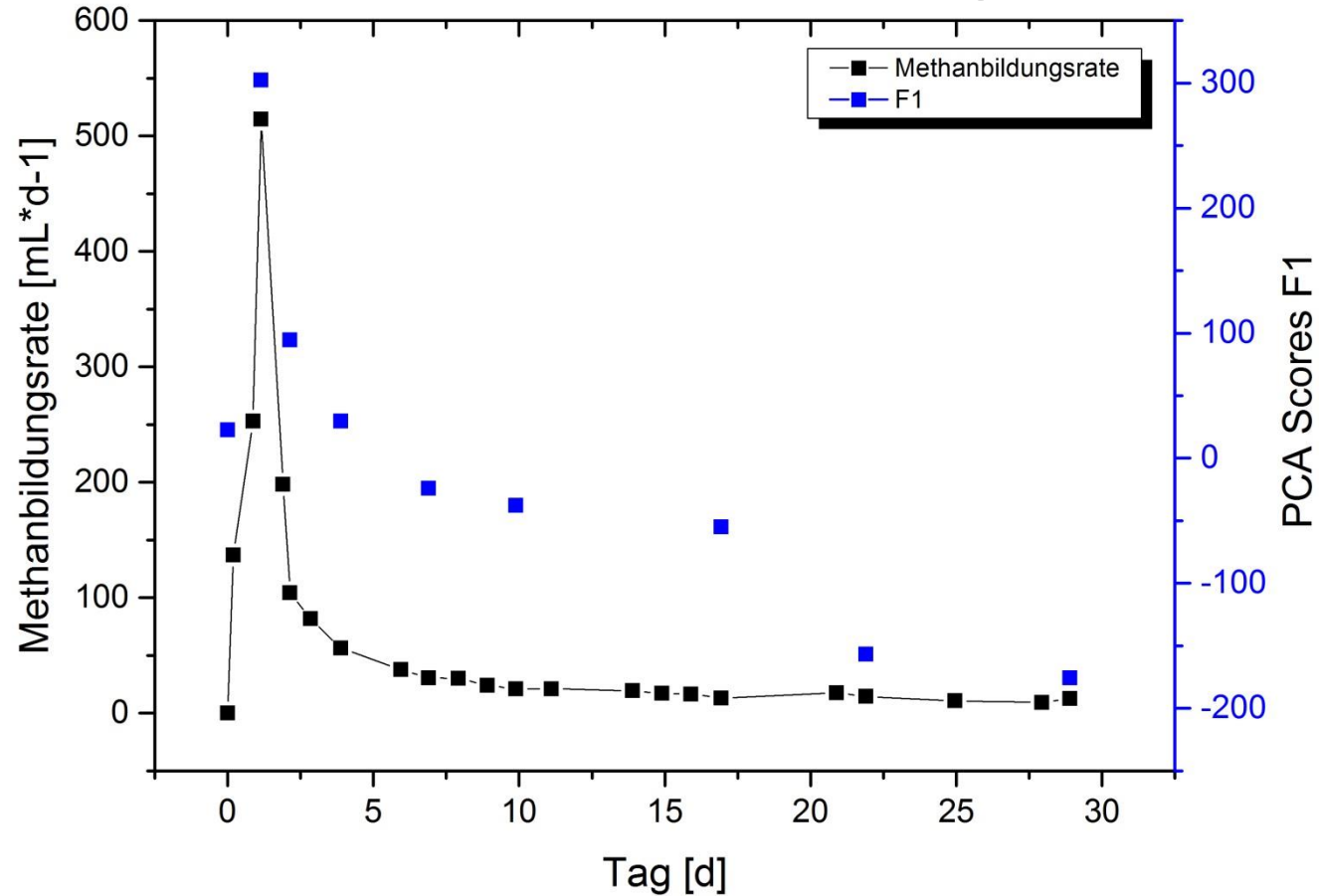
Inokulum: **Klärschlamm**



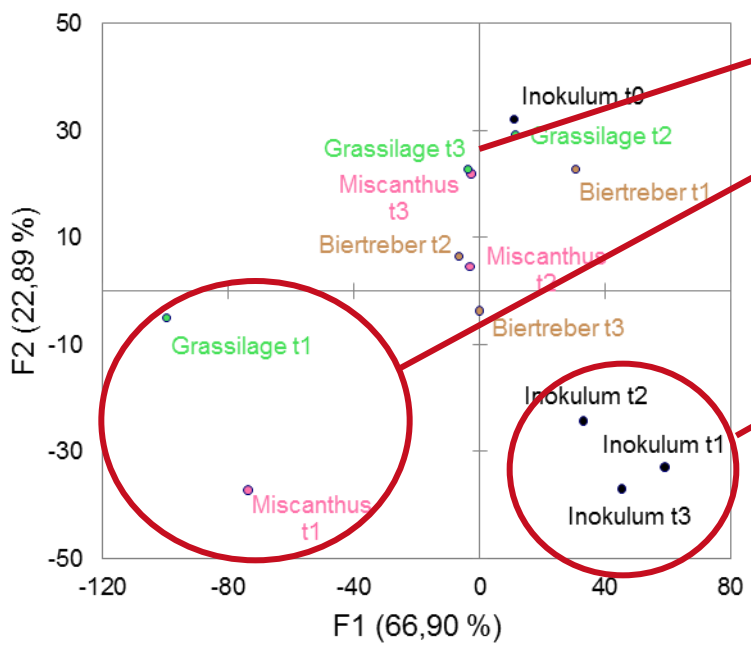
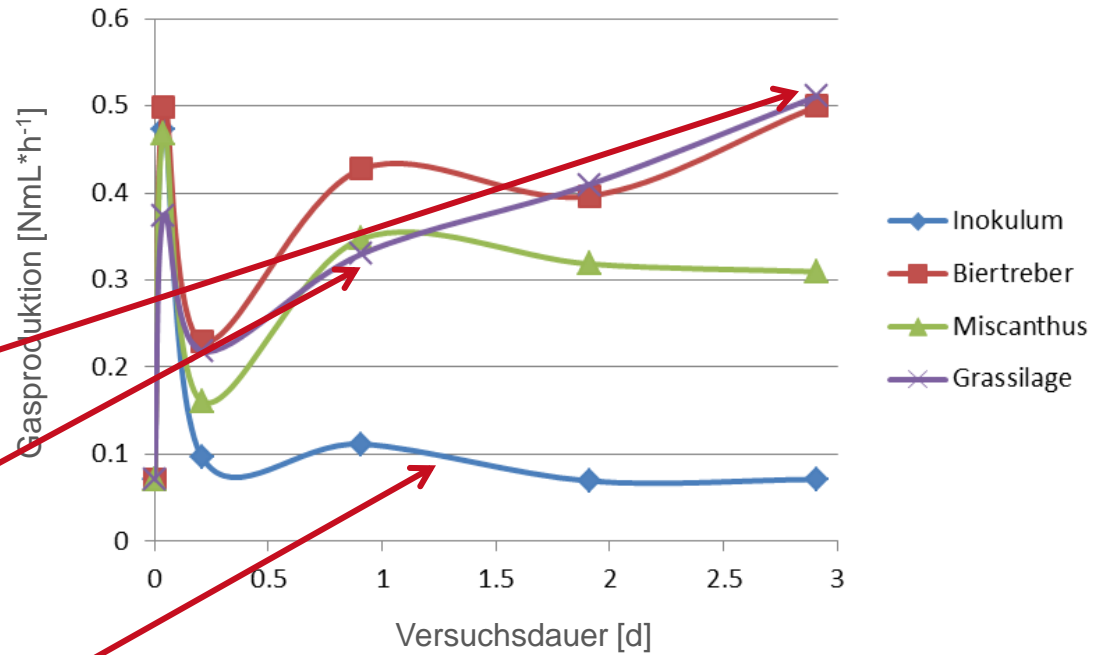
Zellstatus-Monitoring –

Zusammenhang Methanbildungsrate und Polarisierbarkeit

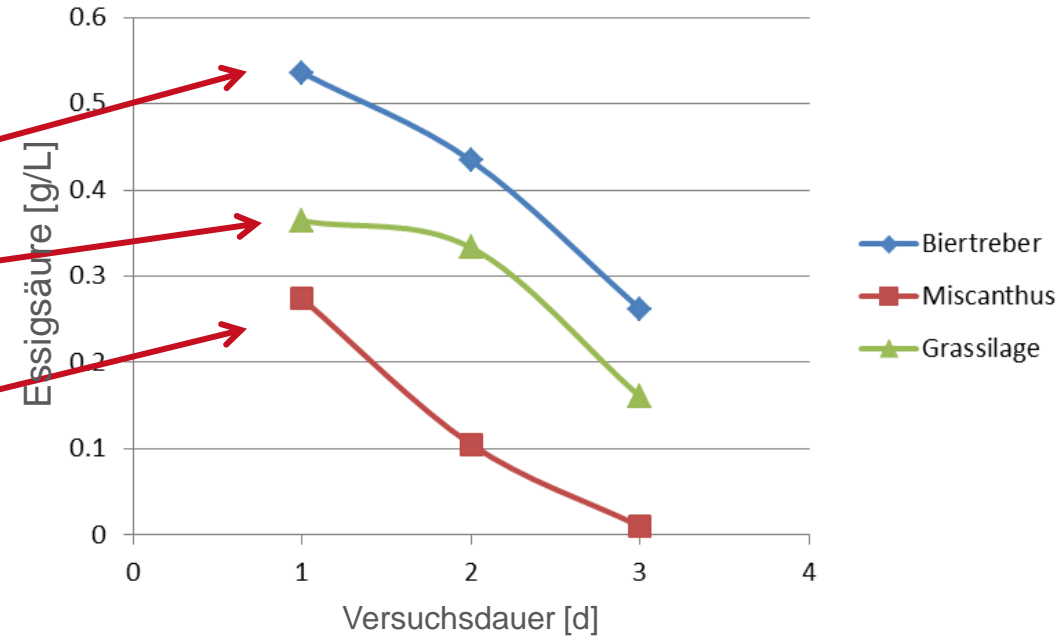
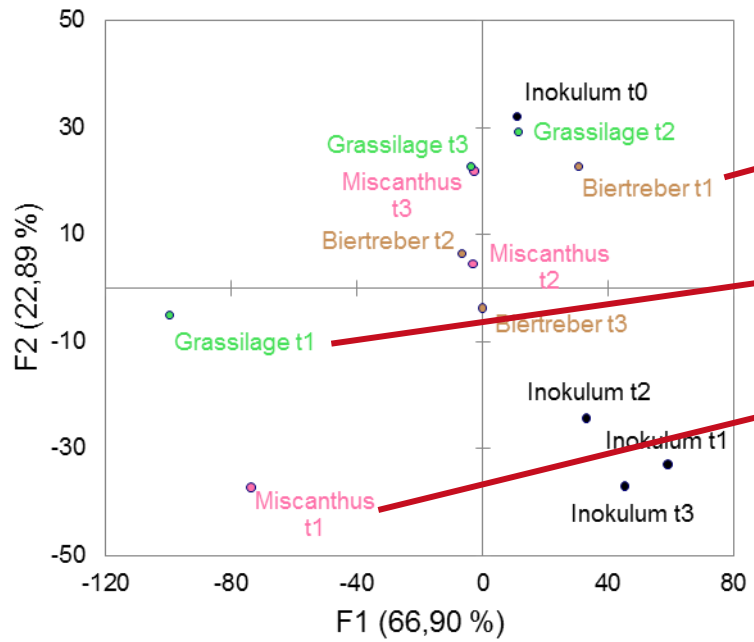
Inokulum: NaWaRo-Anlage



Zellstatus-Monitoring – Parallele Batch-Gärtests



Zellstatus-Monitoring – Parallele Batch-Gärtests



Zusammenfassung & Ausblick

Die elektrooptische Messung mit Proben aus einem Laborbioreaktor ist für Substrate mit einem hohen Anteil an nachwachsenden Rohstoffen durchgeführt worden.

- Die Anwendung konnte in Biogasprozessen im Labormaßstab erfolgreich angewendet werden, eine multivariate Datenanalyse wird derzeit durchgeführt
- Die elektrooptische Messmethode liefert eine Aussage über die Stoffwechselaktivität von Zellen in Biogasproben
- Die Probenaufbereitung zur elektrooptischen Messung wird weiter optimiert und automatisiert.
- Eine Anwendung in industriellen Prozessen wird vorbereitet.

Wie viel früher kann eine Veränderung des Zellzustandes detektiert werden?



Technische
Universität
Berlin



GEFÖRDERT VON:



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

KOORDINIERT DURCH:



Johanna Koserske
Peter Neubauer
Stefan Junne



Boris Habermann
Emma Ritzi
Jörn Beheim-Schwarzbach



Alexander Angersbach



Torsten Unmack
Vincent Pelenc



noch

FRAGEN



www.bioprocess.tu-berlin.de

www.bioprocess.tu-berlin.de





Zellgrößenbestimmung mit dem BIO Cell Analyser „IPAS“ (BCA)

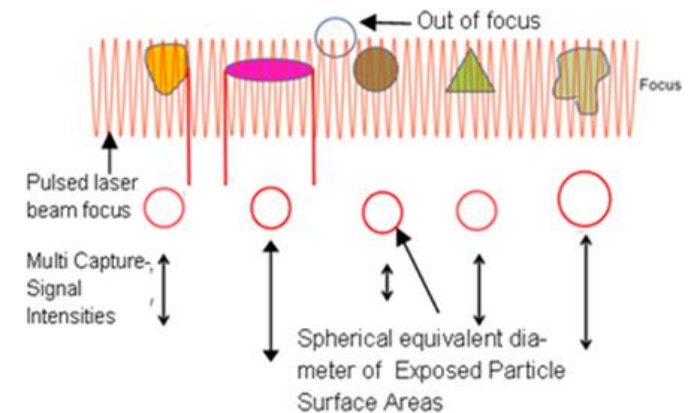
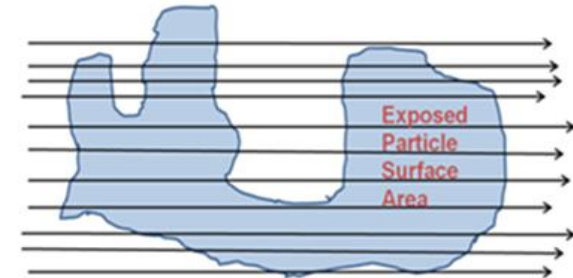
Laser light beam reflection-based method for analyzing the single-cell particle size distribution *in situ*



Autofocus area with an adjustable length of 125 μm

Light transmission via a glasfiber for wavelengths between 660 and 780 nm

Erfahrung in der Anwendung in Reinkulturen



Methoden zur Bewertung der Probenvorbereitung