

Biophysikpraktikum

Versuch:

Motilität einzelliger Algen

I Ziel des Versuches:

Bei diesem Versuch werden einige Grundlagen der Mikrobiologie vermittelt. Hierzu wird mit einer Kultur einer Mikroalge gearbeitet, wobei die Zellen mikroskopisch untersucht werden.

- Erlernen des sterilen Arbeitens
- Statistisches Auswerten

II Aufgabenstellung:

Aus einer Zellkultur der Mikroalge *Chlamydomonas reinhardtii* sollen unter sterilen Bedingungen Proben entnommen werden. Von diesen Proben sollen Videosequenzen unter verschiedenen Einflüssen aufgenommen werden. Anhand der Videos werden mit einem vorhandenen MatLab-Programm verschiedene Motilitäts-Parameter ermittelt. Diese Motilitätsmessungen werden unter Berücksichtigung der phototaktischen und anhaftenden Eigenschaften der Algen ausgewertet und diskutiert.

Die Motilitätsmessungen sind auf einem unbeschichteten Objektträger unter verschiedenen Beleuchtungsstärken mit weißem Licht sowie unter einem Rotfilter durchzuführen. Die Messungen sind mit einem beschichteten Glas (Polyethylenglycol) zu wiederholen.

Es ist eine Wachstumskultur unter sterilen Bedingungen anzupflanzen (vorbereitetes TAP-Medium).

Unter der Sterilbank ist aus einer vorbereiteten Kultur eine Probe zu entnehmen. Deren Zellzahl ist unter dem Mikroskop (in Zellen pro ml) mit Hilfe einer Neubauer improved Zählkammer zu bestimmen.

III Literatur

[1] D. Stern, G. Witman, E. H. Harris "The Chlamydomonas Sourcebook"

[2] Hannah H. Tuson and Douglas B. Weibel, [Bacteria-surface interactions](#), SoftMatter, 2013, **9**, 4368

[3] Hüseyin Kurtuldu Jeffrey S. Guasto Karl A. Johnson and J. P. Gollub, [Enhancement of biomixing by swimming algal cells in two-dimensional films](#)

- [4] Eric Lauga and Thomas R Power, [The hydrodynamics of swimming microorganisms](#), Rep. Prog. Phys. **72** (2009) 096601 (36pp)
- [5] Guasto, Johnson, Gollub, [Oscillatory Flows Induced by Microorganisms Swimming in Two Dimensions](#), PRL 105, 168102 (2010)
- [6] E. M. Purcell, Life at low Reynolds number, Am. J. Phys. 45 (1977)
- [7] H. Qian, M.P. Sheetz, E.L. Elson, Single particle tracking. Analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems, Biophysical Journal, Volume 60, Issue 4, 1991, pp 910-921.
- [8] Zbiranski, HU Berlin, <http://mars.wiwi.hu-berlin.de/mediawiki/mmstat3/index.php/Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion> (18.05.2017)
- [9] Rezept Kulturmedium nach Gorman, D.S., and R.P. Levine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **54**, 1665-1669 (1965).<http://www.chlamycollection.org/methods/media-recipes/tap-and-tris-minimal/http://www.chlamycollection.org/methods/media-recipes/hutners-trace-elements/>

IV Notwendige Vorkenntnisse:

Reynoldszahl, mittlere Quadratische Verschiebung, Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion

V Grundlagen zum Versuch:

1. Mikroschwimmer

Es gibt zwei unterschiedliche Arten von Mikroschwimmern: „puller“ und „pusher“.

Zu den Puschern gehören u. a. *Escheria coli* und Spermazellen (Bild 1a). Sie bewegen sich mit einer Art Korkenzieherantrieb, in dem sie die Flagellen in einem Bündel rotieren lassen. D. h. sie nutzen den Rückstoß des Wassers um sich fortzubewegen. Zu den Pullern gehört die hier zu untersuchende Alge, *Chlamydomonas reinhardtii* (CR) (Bild 1b). Sie führt eine Art Brustschwimmbewegung aus, indem sie das Wasser seitlich am Körper entlang nach hinten drückt [4,6].

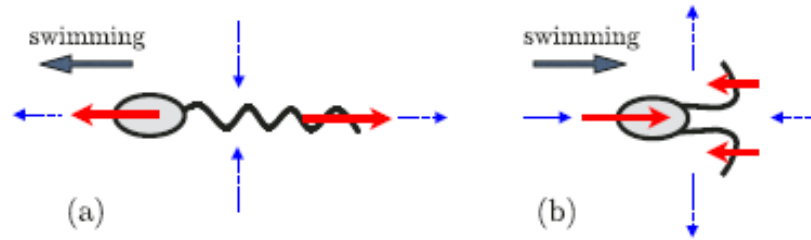


Bild 1: Vergleich von Mikroschwimmern. (a) "pusher"-Typ Schwimmer und (b) "puller"-Typ Schwimmer. Die roten Pfeile geben die Bewegungsrichtung der Zelle, bzw. deren Flagellen an, die blauen das Flussfeld des umgebenden Mediums. [4]

2. Schwimmen bei kleinen Reynoldszahlen

Bei kleinen Reynoldszahlen ($Re \ll 1$) verhält sich die Fortbewegung von Mikroorganismen anders, als man es aus dem Alltag gewohnt ist.

Bei großen Reynoldszahlen kann die Trägheit genutzt werden, welche für Mikroorganismen verschwindend gering ist. Außerdem zählt für sie nur der Moment, was zur Folge hat, dass ihre Schwimmbewegung asymmetrisch sein muss, um sich fortbewegen zu können. Sonst würde der Einzeller wieder an seinem Ausgangspunkt landen, nachdem ein Zyklus der Schwimmbewegung abgeschlossen ist [6].

Speziell für CR heißt das, dass sie ihre Flagellen dicht am Körper zurückholen muss, um sie wieder in die Ausgangslage zu bringen. Dabei bewegt sie sich allerdings wieder ein Stück rückwärts (Bild 2) [1].

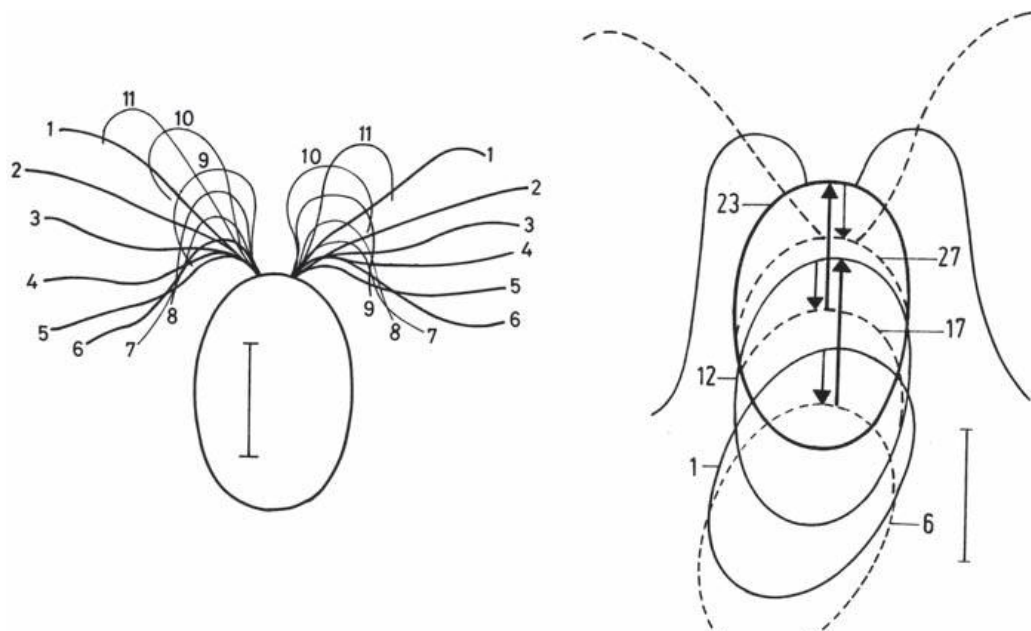


Bild 2: links: Zeitlicher Verlauf der Flagellenbewegung im Laufe eines Schwimmzyklus. 1-6 zeigen den Verlauf der Vorwärtsbewegung, 7-11 das Zurückbringen der Flagellen in die Ausgangsposition. (rechts) Position einer anderen Zelle während drei Schlägen. Die durchgezogene Linie markiert die Zelle am Ende der Vorwärtsbewegung, die gestrichelte Linie am Ende der Rückwärtsbewegung. Für den letzten Schlag ist die Position der Flagellen am Anfang der effektiven (gestrichelten Linie) und der Erholungshub (durchgezogene Linie) gegeben. Pfeile zeigen Richtung und Kraft der Bewegung an. Skala = 5 μm [1].

3. Zellwachstum

Die Kolben für die Kultivierung werden mit einer definierten Zellzahl angeimpft. Die Algen haben eine Generationszeit von 8-12 Stunden, je nach Kulturbedingungen (Temperatur und Kulturmedium). Durch den hell-dunkel Rhythmus erreicht man, dass die Zellen sich alle im gleichen Zustand befinden, d. h. sie teilen sich am Ende der Dunkelphase und wachsen dann anschließend auf die normale Größe (ca. 10 μm Durchmesser) heran [1].

Im Bild 3 ist die Wachstumskurve von *Chlamydomonas reinhardtii* in verschiedenen Kolben dargestellt. Tag Null entspricht dabei dem Tag der Animpfung. Der Bereich des exponentiellen Wachstums endet bei Tag 6. Da mit einer definierten Zellzahl angeimpft wird, ist der Verlauf der Kurve immer gleich.

Erfahrungsgemäß sind die Zellen allerdings am Tag 9 am „aktivsten“, d. h., das Verhältnis zwischen beweglichen Zellen und der Gesamtzahl der Zellen ist am größten und auch die durchschnittliche Geschwindigkeit der Zellen ist dann am höchsten.

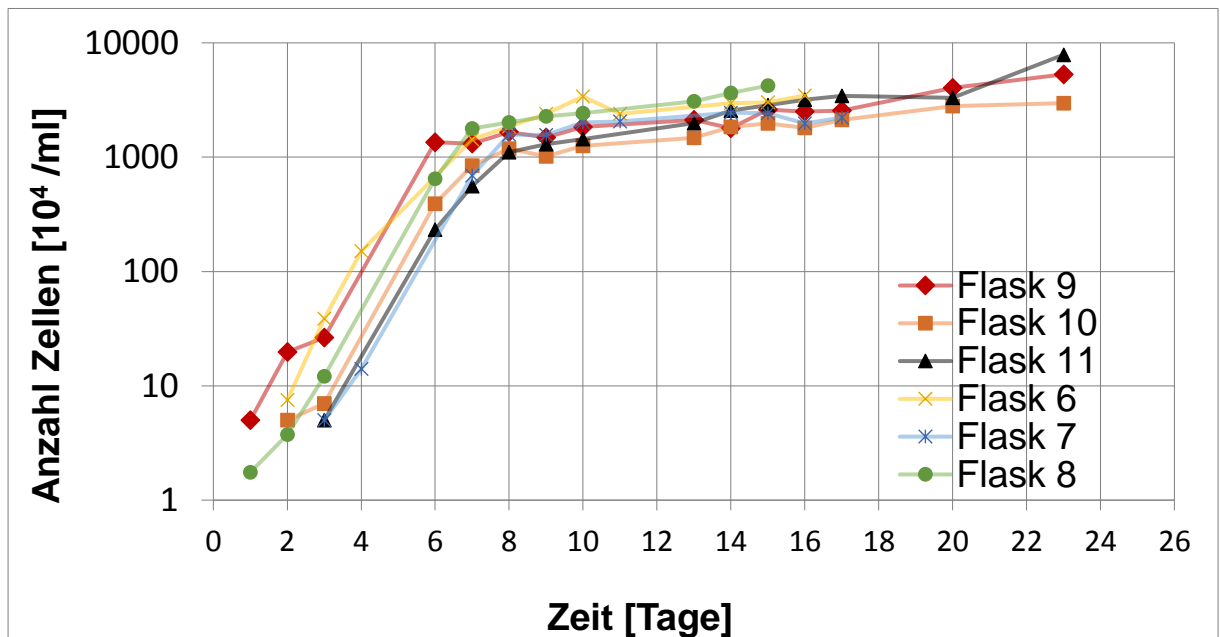


Bild 3 Wachstumskurve in verschiedenen Kolben von *Chlamydomonas reinhardtii*. Der erste Messpunkt entspricht jeweils der Messung am Tag nach der Animpfung eines neuen Kolbens. Die Zellen befinden sich bis zum Tag 6 im exponentiellen Wachstum.

4. Statistisches Auswerten, Diffusionsberechnung

Beim particle tracking (Partikel Verfolgung) werden aus einer Bildsequenz die Positionen von j Teilchen \vec{x}_j in jedem Bild t bestimmt. Dies ergibt einen Satz von Koordinaten $\vec{x}_j(t)$ für jedes Bild t . Aus diesen Koordinaten wird für die aufeinanderfolgenden Bilder $\vec{x}_j(t)$ und $\vec{x}_j(t+1)$ mittels einer Korrelationsfunktion berechnet, welche Koordinaten zu der Trajektorie $r(t) = [x(t), y(t)]$ des Teilchens j gehören.

Bedingung hierfür ist jedoch, dass die Teilchen sich von einem Bild zum darauffolgenden nicht weiter bewegen dürfen, als der Abstand zwischen zwei Teilchen in einem Bild beträgt.

Aus diesen Trajektorien kann dann mittels der Mittleren Quadratischen Verschiebung (mean square displacement, MSD) $\rho(t)$ die Diffusion von Partikeln bestimmt werden, wobei D die Diffusionskonstante ist:

$$\rho(t) = \langle (r(t))^2 \rangle = \langle [r(t) - r(0)]^2 \rangle_j = 4Dt \quad (1)$$

Die Mittelung $\langle \dots \rangle$ wird dabei nicht nur über alle Trajektorien, sondern auch über alle Anfangspositionen $r(0)$ bestimmt. Findet die Diffusion in einem begrenzten Gebiet statt, z. B. in einem Kreis mit dem Radius R , so ergibt sich für die MSD $\rho(\infty) = 2(\langle r^2 \rangle - \langle r \rangle^2)$, was proportional zur Größe des Gebietes ist; im Falle des Kreises $\rho(\infty) = R^2$ (in diesem Fall spricht man von Subdiffusion). Der Verlauf von $\rho(t)$ ist im Bild 4 dargestellt.

Liegt der reinen Diffusion noch ein zusätzlicher konstanter Fluss der Geschwindigkeit v zu Grunde, so spricht man von Superdiffusion. Für die MSD gilt dann:

$$\rho(t) = 4Dt + v^2 t^2 \quad (2)$$

Wichtig für die Bestimmung der Diffusion ist die Festlegung der maximalen Messdauer. Diese muss viel kleiner sein als $L^2/4D$. L ist dabei die Größe des Partikels, in unserem Fall der Alge, für die gilt $L \sim 10 \mu\text{m}$. Die Diffusion liegt für die meisten Zelleexperimente bei $D \sim 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$. Damit gilt $\frac{L^2}{4D} > 10^3 \text{ s}$.

Da die Zeit t bei vorhandener Drift quadratisch in die MSD eingeht, trägt sie einen größeren Teil bei, als im diffusiven Term für lange Beobachtungszeiten. Bei sehr kurzen Beobachtungszeiten dominiert allerdings der diffusive Term ($t \ll 4D/v^2$) [7].

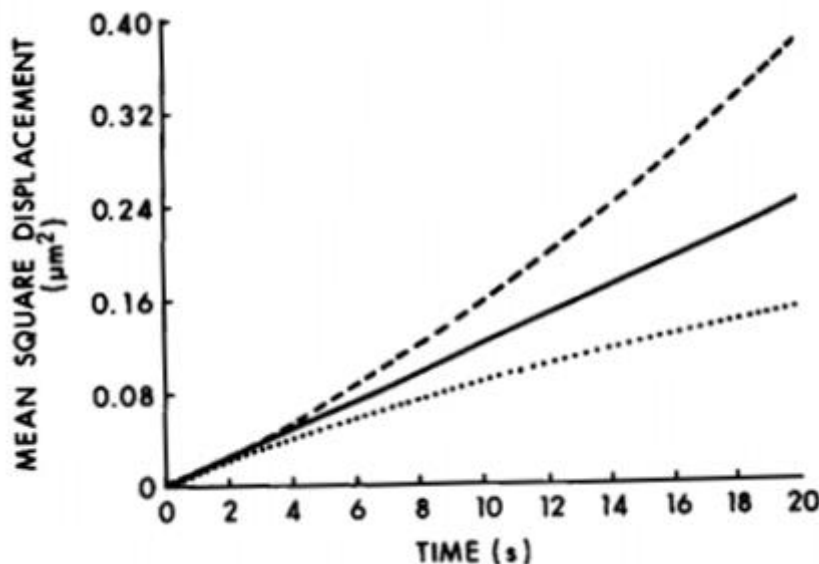


Bild 4: Die MSD als Funktion der Zeit t für reine Diffusion (—), Diffusion mit einem Fluss (Superdiffusion) (---) und räumlich beschränkter Diffusion (Subdiffusion) (...) [7].

Aus den Trajektorien der Zellen kann nun auch die individuelle Geschwindigkeit der Zellen berechnet werden. Dazu wird die Änderung der Position einer Zelle zwischen zwei aufeinanderfolgenden Bildern berechnet und durch die Bilderzahl pro Sekunde geteilt.

Aus diesen individuellen Geschwindigkeiten werden nun die Zellen ausgeschlossen, die sich kaum oder nur sehr langsam ($\ll 30 \mu\text{m/s}$) bewegen, um das Mobilitätsverhältnis (Verhältnis der sich bewegenden Zellen und Gesamtzahl der Zellen) zu ermitteln.

Aus den individuellen Geschwindigkeiten wird weiterhin die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion (probability density function; PDF) berechnet.

Eine kontinuierliche Zufallsvariable nimmt unendlich viele mögliche Werte an. Für eine diskrete Zufallsvariable X , die eine endliche Anzahl an möglichen Werten annimmt, wird für alle Werte von X die Wahrscheinlichkeit $P(X=x)$. Für kontinuierliche Zufallsvariablen, ist die Wahrscheinlichkeit, dass X einen bestimmten Wert x annimmt gleich Null. Somit ist das Bestimmen von $P(X=x)$ für eine kontinuierliche Zufallsvariable X nicht möglich. Stattdessen muss die Wahrscheinlichkeit gefunden werden, dass X in einem Intervall (a,b) liegt ($P(a < X < b)$). Werden die Intervalle nun unendlich klein gewählt, so entsteht eine kontinuierliche Funktion, die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion, für die gelten muss:

$$\int_{-\infty}^{\infty} f(x) dx = 1 \quad (3)$$

Zunächst muss also die relative Häufigkeitsverteilung der Geschwindigkeiten der Zellen berechnet werden. Um die Dichtefunktion für die Zufallsvariable X zu erhalten, wird zunächst die Häufigkeitsdichte berechnet, die man als relative Häufigkeit dividiert durch die Intervallbreite erhält [8].

VI Versuchsdurchführung

Materialien und Geräte:

Für die Versuche wird der Algenstamm 11-32a (SAG Göttingen) verwendet. Kultiviert wird die Alge in einem Erlenmeyerkolben in TAP-Medium (Tris-Acetate-Phosphate) bei einem pH-Wert von 7 [9]. Die Temperatur beträgt $21 \text{ }^\circ\text{C}$ und die Beleuchtung erfolgt mittels einer kaltweißen Leuchtstoffröhre (2 x 15W/77 der Firma Osram) in einem 14:10 h (hell-dunkel) Rhythmus. Die Kulturen werden mittels angefeuchteter Druckluft belüftet.

Mikroskop

Kamera

Photometer Tectronic Lumacolor J17 m. Messkopf

Rotlichtfilter

Sterile Werkbank

Brenner
Objektträger m. versch. Beschichtung
Neubauer improved Zählkammer
Zentrifuge, Rotor, Zentrifugenröhrchen
Jod-Kaliumjodid-Lösung
Eppendorff-Reaktionsgefäße
Pipetten
Reagenzgläser

Versuch 1

Ermittlung der Geschwindigkeiten in Abhängigkeit von der Beleuchtung und der Oberfläche

Vorversuch:

Ermitteln Sie mit dem Photometer die Lichtintensität für verschiedene Einstellungen am Mikroskop und im Weißlicht und mit Rotfilter.

Entnehmen Sie nun unter sterilen Bedingungen ca. 5 ml Probe mit Algen aus dem Kultivierungsgefäß.

Verdünnen Sie die Probe in einem weiteren Röhrchen im Verhältnis 1:1 mit Kulturmedium

Zwischen den Messungen bewahren Sie das Proberöhrchen unter der Leuchtstoffröhre auf.

Pro Messreihe tragen Sie einen Tropfen der Algenkultur auf einen Objektträger auf und bedecken Sie diesen mit einem Deckgläschen.

Messreihe 1

Beginnen Sie mit der geringeren Beleuchtungsintensität, nehmen Sie bei 10-facher Vergrößerung mit der Kamera jeweils eine Bildsequenz von 20 Sekunden auf.

Inkubieren Sie die Algenprobe nach dem Platzieren und Einstellen der Beleuchtung für jeweils 60 Sekunden.

Messreihe 2

Für Messreihe 2 wiederholen Sie dieses bei roter Beleuchtung.

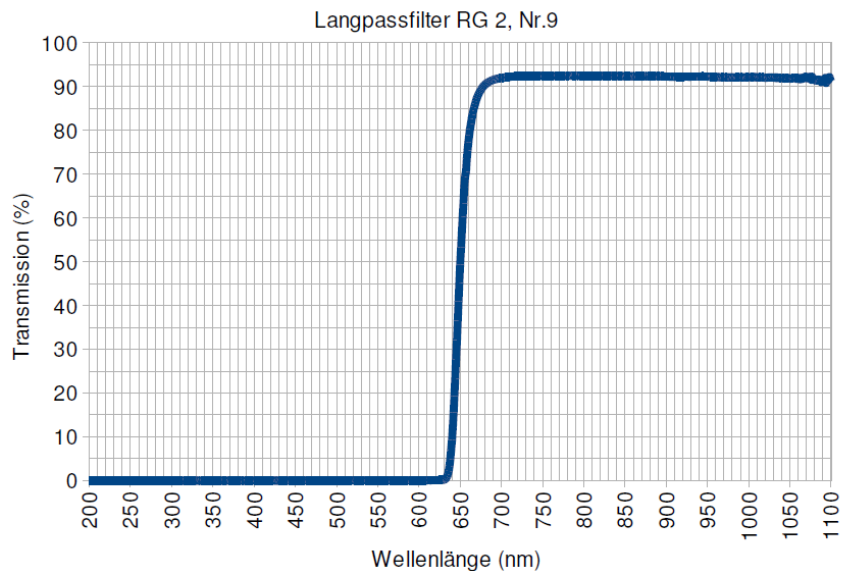


Bild 5: Transmissionsspektrum des zur Beleuchtung verwendeten Rotfilters

Messreihen 3 und 4

Nun führen Sie die Messungen mit PEG (Polyethylenglycol)-beschichteten Objektträgern und Deckgläschen durch.

Versuch 2

Animpfen eines Wachstumskolbens

Nehmen Sie eine neue Probe aus dem Wachstumskolben. Bestimmen Sie von dieser mit Hilfe einer Neubauer improved-Zählkammer die Zellzahl.

Dazu müssen die Zellen immobilisiert werden.

Gehen Sie hierzu folgendermaßen vor:

Geben Sie je 0,4 ml Probe in zwei Reaktionsgefäße. Zentrifugieren Sie mit folgenden Einstellungen:

$t=10$ min

Drehzahl= 10.000g

Rotor: 12154

Nehmen Sie nun vom Überstand 0,3 ml ab und ersetzen Sie diesen durch Jod-Kaliumjodid-Lösung.

Tragen Sie beim Umgang mit der Jod-Kaliumjodid-Lösung Schutzhandschuhe.

Prüfen Sie, ob vor der Zählung gegebenenfalls verdünnt werden muss.
Bestimmen Sie nun die Zellzahl.

Anhand der ermittelten Zellzahl können Sie nun das benötigte Volumen zum Animpfen einer neuen Kultur berechnen.

Angeimpft werden soll mit einer Zellzahl von 10^5 1/ml auf ein Volumen von 333 ml.

Impfen Sie nun die neue Wachstumskultur an.

VII Auswertung

Ermitteln Sie aus Ihren Videodaten mit Hilfe eines vorhandenen MatLab-Programms das Motilitätsverhältnis für alle Beleuchtungsintensitäten und für die verschiedenen Oberflächen.

Bestimmen Sie ebenfalls die PDF (Standardabweichung und Mittelwert) und vergleichen Sie den hieraus berechneten Mittelwert für die Geschwindigkeiten mit dem zuvor ermittelten Wert.

Bestimmen Sie mit Hilfe eines weiteren MatLab-Programms die MSD für einzelne Zellen. Aus dem Verlauf der MSD ist abzuleiten, welche Bewegung die Alge durchführt. Dazu werden je Messung drei einzelne Trajektorien der Algen ausgewählt, die einen möglichst linearen Verlauf aufweisen.

Wählen Sie hierzu aus jeder Messreihe eine Messung bei mittlerer Beleuchtungsintensität.

Können Sie Unterschiede der Motilität zwischen Ihren Messreihen feststellen?
Diskutieren Sie diese.