

Untersuchung der Auswirkung verschiedener Umwelteinflüsse auf Mikroorganismen mittels orts aufgelöster Raman-Spektroskopie



seit 1558

Kumulative Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena von

Dipl.-Chem. Ute Münchberg

geboren am 12.07. 1981 in Apolda

Gutachter:

1. Prof. Dr. Jürgen Popp
Institut für Physikalische Chemie, Friedrich-Schiller-Universität Jena
2. Prof. Dr. Michael Bauer
Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Friedrich-Schiller-Universität
Jena

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06. August 2014

Inhaltsverzeichnis

Bestandteile der Dissertation	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	V
1 Zusammenfassung	1
1.1 Motivation	1
1.2 Stand der Forschung	7
1.2.1 Identifizierung von Bakterien unter Stress	7
1.2.2 Lipide als Speicherstoffe in Pilzen	15
1.3 Eigene Forschungsergebnisse	25
1.3.1 Untersuchung von antibiotisch behandelten Bakterien	25
1.3.2 Qualitative Untersuchung von Pilzlipiden mit Raman-Spektroskopie	31
1.3.3 Quantifizierung des Sättigungsgrades von Pilzlipiden mit Raman-Spektroskopie	35
1.4 Resümee	40
1.5 Conclusions	42
Literaturverzeichnis	51
2 Veröffentlichungen	52
2.1 Raman-spectroscopic identification of single bacterial cells under antibiotic influence [UM01]	52
2.2 Spatially resolved investigation of the oil composition in single intact hyphae of <i>Mortierella spp.</i> with micro-Raman spectroscopy [UM02]	88
2.3 Quantitative assessment of the degree of lipid unsaturation in intact <i>Mortierella</i> by Raman microspectroscopy [UM03]	105

3 Publikationen	154
3.1 Referierte Publikationen	154
3.2 Buchkapitel	155
3.3 weitere Publikationen	155
4 Beiträge zu Konferenzen und wissenschaftlichen Symposien	156
4.1 Vorträge	156
4.2 Posterbeiträge	156
Danksagung	158
Selbstständigkeitserklärung	160

Bestandteile der Dissertation

Die folgenden Publikationen sind Bestandteil der vorliegenden kumulativen Dissertation.

Raman-spectroscopic identification of single bacterial cells under antibiotic influence, Ute Münchberg, Petra Rösch, Michael Bauer, Jürgen Popp, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406, **2014**, pp. 3041-3050.

Spatially resolved investigation of the oil composition in single intact hyphae of *Mortierella spp.* with micro-Raman spectroscopy, Ute Münchberg, Lysett Wagner, Eike T. Spielberg, Kerstin Voigt, Petra Rösch, Jürgen Popp, *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831, **2013**, pp. 341-349.

Quantitative assessment of the degree of lipid unsaturation in intact *Mortierella* by Raman microspectroscopy, Ute Münchberg, Lysett Wagner, Carsten Rohrer, Kerstin Voigt, Petra Rösch, Gerhard Jahreis, Jürgen Popp, *Journal of Lipid Research*, eingereicht am 20. Dezember 2013.

Abkürzungsverzeichnis

ARA	Arachidonsäure, englisch <i>arachidonic acid</i>
DHA	Docosahexaensäure, englisch <i>docosahexaenoic acid</i>
EPA	Eicosapentaensäure, englisch <i>eicosapentaenoic acid</i>
GC	Gaschromatographie
GLA	γ -Linolensäure, englisch <i>γ-linolenic acid</i>
GYA	Glycerinagar
HCA	hierarchische Clusteranalyse
HUFA	hochungesättigte Fettsäure, englisch <i>highly unsaturated fatty acid</i>
LDA	lineare Diskriminanzanalyse
LESA-MS	Lipid-Extraktions-Oberflächenanalysen-Massenspektrometrie, englisch <i>lipid extraction surface analysis mass spectrometry</i>
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorptions-Ionisation, englisch <i>matrix assisted laser desorption/ionization</i>
MALDI-TOF	Matrix-unterstützte Laser-Desorptions-Ionisation gekoppelt mit Flugzeitdetektion, englisch <i>matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight</i>
MEA	Malzextraktagar
MIC	minimale Hemmkonzentration, englisch <i>minimum inhibitory concentration</i>
PC	Hauptkomponente, englisch <i>principal component</i>
PCA	Hauptkomponentenanalyse, englisch <i>principal component analysis</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion, englisch <i>polymerase chain reaction</i>
PHA	Polyhydroxyalkanoat
PHB	Polyhydroxybutyrat
PUFA	mehrfach ungesättigte Fettsäure, englisch <i>polyunsaturated fatty acid</i>
SCO	Einzelzell-Öl, englisch <i>single cell oil</i>

Abbildungsverzeichnis

1.1	Vergleich der Größe des Laser-Messpunktes mit der Größe verschiedener Mikroorganismen.	5
1.2	Chemische Strukturen verschiedener mikrobieller Speicherstoffe.	16
1.3	Chemische Strukturen wichtiger PUFAs.	17
1.4	Ergebnisse der LDA-Klassifikation nach Taxonomie (A) oder Antibiotikabehandlung (B).	28
1.5	Probenkultivierung für orts aufgelöste Untersuchungen.	33

Kapitel 1

Zusammenfassung

1.1 Motivation

Mikroorganismen sind in unserer Welt allgegenwärtig. Nahezu jeder Fleck der Erde ist von ihnen besiedelt. Dabei existieren sie nicht isoliert, sondern sind permanent verschiedensten Umwelteinflüssen ausgesetzt, die ihr Überleben beeinflussen. Beispiele hierfür sind die Nähe von Nahrungskonkurrenten oder Fressfeinden. Aber auch die Verfügbarkeit verschiedenster Nährstoffe oder die Anwesenheit wachstumshemmender oder giftiger Substanzen zählen zu den Umwelteinflüssen.

Diese vielfältigen Umwelteinflüsse zwingen Mikroorganismen, darauf zu reagieren um zu überleben. Dabei verlangen positive Einflüsse wie das Vorhandensein von Nahrung eine andere Reaktion als negative Einflüsse wie beispielsweise Trockenheit oder Fressfeinde. Dementsprechend haben sich eine ganze Reihe an Strategien herausgebildet, wie Mikroorganismen sich an die Anforderungen ihres Lebensraumes anpassen oder auf wechselnde Umwelteinflüsse reagieren.

Viele Mikroorganismen sind in der Lage, Art und Anzahl anderer Mikroben in ihrer unmittelbaren Umgebung wahrzunehmen und darauf zu reagieren.[1] Eine ganze Reihe von Mikroben haben beispielsweise Strategien entwickelt, um sich vor Fressfeinden zu schützen,[2, 3] unter anderem indem sie spezielle Substanzen produzieren.[4] Andere machen ihren Nachbarn das Überleben schwer, indem sie Substanzen ausscheiden, welche umgebende Nahrungskonkurrenten am Wachstum hindert. Bekanntestes Beispiel dafür sind wohl die Antibiotika, welche von Pilzen produziert und abgesondert werden,[5] um bakterielle Nahrungskonkurrenten in Schach zu halten. Es gibt aber auch den umgekehrten Fall, dass nämlich Bakterien Chemikalien produzieren, welche fungizid wirken.[6] Die so unter Stress gesetzten Mikroben können auf derartige Substanzen mit verschiedenen Abwehrmechanismen reagieren. Viele Pilze und Bakterien können Giftstoffe der Umgebung auch aktiv ausscheiden oder enzymatisch abbauen und so deren schädigende Wirkung verhindern.[6–8] Bei Bakterien ist diese

Resistenzentwicklung besonders intensiv untersucht, da sie direkte Auswirkungen auf die Behandlung von Erkrankungen mit Antibiotika hat.

Manche Organismen können bei zeitweilig ungünstigen Umweltbedingungen spezielle Dauerformen ausbilden. Diese sogenannten Sporen überstehen lange Perioden von Trockenheit, Hitze oder Nahrungsmangel ohne Schaden zu nehmen. Erst wenn die Bedingungen wieder vorteilhaft sind, entwickeln sich aus den Sporen erneut vermehrungsfähige Mikroorganismen. Typische Sporenbildner sind Bakterien der Gattung *Bacillus* und *Chlostridium*,^[9] aber auch andere Mikroben wie Amöben können Sporen bilden.^[1] Umgekehrt sind manche Mikroorganismen bei besonders guten Wachstumsbedingungen in der Lage, wertvolle Nährstoffe zu speichern.

Die Untersuchung solcher Effekte, also die Reaktion von Mikroorganismen auf Variationen ihrer Umwelt, ist von großem Interesse. Wenn die Reaktionen von Mikroorganismen auf Umwelteinflüsse besser verstanden werden, eröffnet das vielfältige Anwendungsmöglichkeiten. So wurde beispielsweise gezeigt, dass Kulturmedien von *Pseudomonas fluorescens* und *Escherichia coli* die Biofilmbildung von *Candida albicans* und auch deren Übergang von der Hefen- in die pathogene filamentöse Wuchsform verhindern können.^[10] Wenn dieser Effekt gezielt hervorgerufen werden könnte, ließen sich viele Infektionen verhindern, die durch Biofilme auf medizinischen Instrumenten hervorgerufen werden.^[11–13] Auch neue medizinische Wirkstoffe oder neuartigen biologischen Werkstoffen könnten durch die Analyse mikrobieller Interaktionen und Anpassungen entdeckt oder gewonnen werden. Die Erforschung von Mikroorganismen und ihrer vielfältigen Reaktionen auf externe Einflüsse ist daher ein interessantes Betätigungsfeld.

Zur Untersuchung der Umwelt- ausgelösten Effekte bei Mikroorganismen gibt es eine Vielzahl an Methoden. Am weitesten verbreitet ist wohl der Ansatz, Mikroorganismen unter variierenden Bedingungen zu kultivieren. Dabei können biochemische Fähigkeiten wie das Wachstumsverhalten auf verschiedenen Nährmedien gut bestimmt werden. Auch Toleranzen gegenüber einer Vielzahl von Einflüssen wie Temperatur, pH, Schwermetallkonzentration, Antibiotika oder andere Substanzen können so sehr genau bestimmt werden. Ebenso kann die Reaktion auf andere Organismen mit diesem Ansatz gut untersucht werden.^[14] Solche Co-Kulturen werden oft angesetzt, um Verteidigungsmechanismen zu provozieren und analysieren zu können. Vorteilhaft bei der kultivierenden Untersuchung ist, dass die Mikroorganismen gut auch in größerem Maßstab gezogen werden können. Dies erleichtert eventuell notwendige anschließende Extraktions- und Isolationsschritte aus dem Medium oder den Organismen.

Oft werden zusätzlich zur Kultivierung weiterführende Techniken angewendet. Beispielsweise können einzelne Metabolite mittels Kernspinresonanz-Spektroskopie, Massenspektrometrie, Chromatographie oder einer Kombination dieser Methoden isoliert, charakterisiert und quantifiziert werden. Auch die Anwendung sogenannter

„Omics“-Untersuchungen (Genomics, Metabolomics, Proteomics) ist möglich, um Veränderungen direkt im Organismus zu analysieren.

Eine weitere leistungsfähige Technik zur Untersuchung von Mikroorganismen und von ihnen produzierten Substanzen sind schwingungsspektroskopische Methoden. Ein bedeutender Vorteil dieser Methoden ist, dass sie zerstörungsfrei arbeiten. Das heißt, dass die Probe nach der spektroskopischen Untersuchung noch intakt ist und für weitere Analysemethoden wie die oben genannten zur Verfügung steht. Darüber hinaus sind schwingungsspektroskopische Techniken geeignet, auch geringe Mengen von Molekülen zu detektieren und zu quantifizieren.[15–17]

In der vorliegenden Arbeit sollen die Auswirkungen von Umwelteinflüssen auf Mikroorganismen spektroskopisch untersucht werden. Dabei liegt der Schwerpunkt auf zwei Arten von Umwelteinflüssen:

negativer Einfluss: Die Reaktion von Bakterien auf den negativen Reiz „Stress“, welcher durch die Applikation von Antibiotika ausgelöst wird, ist ein Schwerpunkt dieser Arbeit. Dabei soll im Hinblick auf die spektroskopische Identifizierung der Bakterien speziell die Frage geklärt werden, wie sehr Antibiotika in verschiedenen Konzentrationen den molekularen Fingerabdruck der Bakterien ändern und ob diese Änderungen von der Art des Antibiotikums abhängig sind.

positiver Einfluss: Die Reaktion auf den positiven Reiz „Nährstoffüberangebot“ soll anhand von Pilzen untersucht werden, die in der Lage sind, kohlenstoffreiche Substrate zu speichern. Dabei stehen die Fragen im Raum, ob die Untersuchung der Speicherstoffe direkt in intakten Hyphen möglich ist, ob die Hyphenmorphologie einen Einfluss auf den Speicherstoff hat und ob quantitative Informationen zur Zusammensetzung direkt zugänglich sind.

Zur Untersuchung dieser Einflüsse wurde die Raman-Spektroskopie gewählt, welche im Folgenden kurz vorgestellt wird.

Raman-Spektroskopie

Die Raman-Spektroskopie ist eine Analysemethode, mit der Informationen über molekulare Schwingungszustände erhalten werden können. Sie liefert Informationen über die chemischen Bindungen in einer Probe und basiert auf einem inelastischen Streuprozess, der 1928 von C. Raman entdeckt wurde. Wird Licht einer bestimmten Wellenlänge auf ein Molekül gestrahlt, so wird es elastisch an dem Molekül gestreut. Das bedeutet, dass das gestreute Licht die gleiche Wellenlänge hat wie das eingestrahlte Licht. Ein Bruchteil des eingestrahltten Lichtes, nämlich etwa eins von 1 000 000 Photonen, kann jedoch inelastisch gestreut werden, seine Wellenlänge ändert sich. Dies

bezeichnet man als Raman-Effekt. Der Betrag, um den der Energiegehalt des Photons sich dabei ändert, entspricht genau der Differenz zwischen zwei Energiezuständen des Moleküls, im hier betrachteten Fall zweier Schwingungsniveaus.

Wird eine Probe nun mit intensivem monochromatischem Licht bestrahlt, beispielsweise mit einem Laser, so wird trotz der geringen Häufigkeit des Effektes eine messbare Anzahl von Photonen inelastisch gestreut. Da jede chemische Bindung eine spezifische Anregungsenergie hat, geben die Energiedifferenzen zwischen eingestrahlttem und gestreutem Licht Auskunft darüber, welche chemischen Bindungen in der Probe vorhanden sind. Diese Differenzen können als Änderungen der Wellenlänge mithilfe eines Spektrometers detektiert und in ein Spektrum übersetzt werden. Das Spektrum als Abbild der molekularen Schwingungen ist dabei so spezifisch, dass ein Molekül anhand seines Schwingungsspektrums eindeutig identifiziert werden kann. Daher bezeichnet man Schwingungsspektren oft auch als „molekularen Fingerabdruck“.

Ein Nachteil der Raman-Spektroskopie ist ihre geringe Sensitivität, da wie bereits erwähnt nur etwa eines von 1 000 000 Photonen inelastisch gestreut wird. Daher ist der Einsatz von Lasern nötig, um monochromatisches Licht ausreichender Intensität auf die Probe zu strahlen. Das birgt durch die hohe Photonendichte und den somit hohen Energieeintrag zwar die Gefahr der Probenverbrennung, diese kann jedoch durch eine geeignete Wahl der Messbedingungen (Anregungswellenlänge, Laserleistung, Probenpräparation) vermieden werden. Es gibt auch Möglichkeiten, die Intensität des Raman-Signals durch Resonanzeffekte zu verstärken. Entspricht die Anregungswellenlänge der Energie eines elektronischen Übergangs im Molekül, so kommt es zu einer Resonanz-Verstärkung. Dadurch können die Raman-Signale einer Verbindung um mehrere Größenordnungen verstärkt werden.[18] Durch geeignete Wahl der Laser-Wellenlänge können auf diese Weise gezielt die Signale einzelner Substanzen oder Substanzklassen wie DNA, Proteine oder Pigmente verstärkt werden.[19–21]

Ein großer Vorteil der Raman-Spektroskopie für die Bioanalytik ist, dass Wasser nur schwache Signale in einem Spektrum hervorruft. Dadurch können lebende biologische Proben untersucht werden, gegebenenfalls auch direkt in wässriger Umgebung. Darüber hinaus kann durch die Kombination eines Raman-Spektrometers mit einem Mikroskop eine hohe Ortsauflösung der spektroskopischen Daten erhalten werden. In Abbildung 1.1 sind exemplarisch Bilder von Bakterien (A) und einer Pilzhyphe (B) sowie jeweils maßstabsgetreu ein Laserfokus von $1 \mu\text{m}$ Durchmesser (Pfeil) gezeigt. Da die spektrale Information nur aus dem Bereich der Laser-Bestrahlung erhalten wird, können somit gezielt Spektren ganzer Bakterienzellen oder einzelner Lipidtropfen in Pilzhypen gemessen werden. Dies ermöglicht die gezielte Untersuchung einzelner Mikroorganismen oder deren Substrukturen.

Da in komplexen Proben wie Mikroorganismen mehrere verschiedene Substanzen vorhanden sind, überlagern sich deren Spektren. Das resultierende Spektrum ist

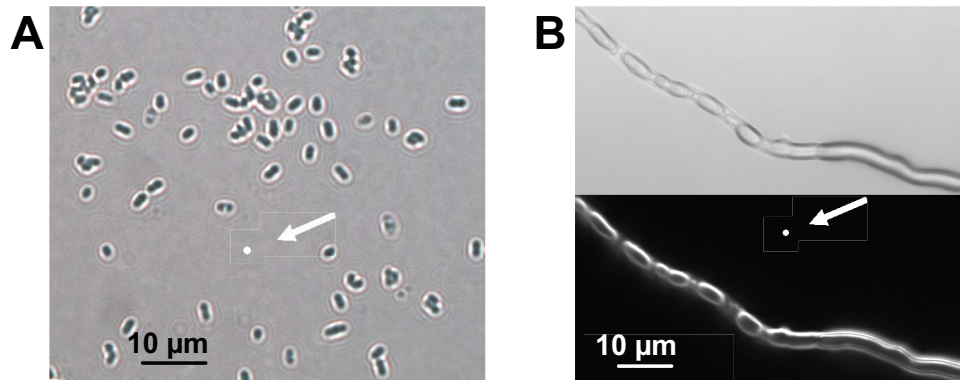


Abbildung 1.1: Vergleich der Größe des Laser-Messpunktes (Pfeil) mit der Größe verschiedener Mikroorganismen. Im Bild A ist eine Bakterienprobe zu sehen. Der Laserpunkt von $1 \mu\text{m}$ ist etwa genauso groß wie eine einzelne Zelle. Im Bild B ist ein Ausschnitt einer lipidhaltigen Hyphe gezeigt. Mit einem Laserfokus von $1 \mu\text{m}$ können problemlos sowohl die kleinen sichtbaren Lipidtropfen als auch große Vesikel spektroskopisch untersucht werden.

dann eine Mischung aus den entsprechenden einzelnen Komponenten. Dabei trägt jede Komponente in dem Maße zum Gesamtspektrum bei, wie sie in der Probe vorhanden ist. Das bedeutet, dass alle biochemischen Komponenten wie Proteine, Lipide, DNA, Kohlenhydrate, aber gegebenenfalls auch Sekundärmetabolite und Pigmente zum Spektrum beitragen. Die einzelnen Banden des Spektrums entstehen daher aus einer Superposition von Banden vieler Komponenten und können dadurch häufig nicht mehr nur einer Substanz oder Substanzklasse zugeordnet werden.

Da die biochemische Zusammensetzung verschiedener Mikroorganismen oft ähnlich sind, sind auch deren Spektren einander sehr ähnlich. Um trotz dieser Ähnlichkeit den molekularen Fingerabdruck eines Mikroorganismus zu erkennen, ist ein bloßer visueller Vergleich der Spektren nicht mehr ausreichend. Deshalb kommen dafür chemometrische Methoden zum Einsatz.

Chemometrik

Die Chemometrik ermöglicht die Gruppierung verschiedener Spektren eines Datensatzes mittels einer Vielzahl von Klassifikationsalgorithmen. Dabei gibt es mehrere Ansätze, nach denen ein solcher Algorithmus Daten in verschiedene Gruppen einordnet.

Ein Ansatz sind die unüberwachten Methoden. Bei diesen geht keine Information über die eigentliche Gruppenzugehörigkeit in den Prozess der Gruppierung ein. Die Daten werden lediglich nach Ähnlichkeit oder Abstand zueinander eingeteilt. Ein Beispiel dafür ist die hierarchische Clusteranalyse (HCA), bei der die einzelnen Spektren

aufgrund ihrer räumlichen Nähe zueinander zu Gruppen zusammengefasst werden.[22] Vorteil solcher unüberwachten Methoden ist, dass sich damit auch in Datensätzen mit unbekannter Zusammensetzung Gruppen erkennen lassen. Ein Nachteil ist aber, dass diese Methoden kein Modell liefern, mit dem neue Daten schnell und sicher zugeordnet werden können. Stattdessen muss stets die gesamte Berechnung neu erfolgen, was insbesondere bei umfangreichen Datensätzen sehr rechenintensiver Aufwand ist.

Eine weitere Möglichkeit der Klassifizierung sind überwachte Methoden. Bei diesen geht zusätzlich zur spektralen Information auch die Kenntnis über die tatsächliche Gruppenzugehörigkeit in die Analyse mit ein. Anhand eines Datensatzes, bei dem für jedes Element die Gruppenzugehörigkeit (Klasse) bekannt ist, wird ein Modell erstellt. Dieses Modell kann dann verwendet werden, um neue Daten schnell einer der bereits etablierten Gruppen zuzuordnen.[22] Eine solche überwachte Methode ist die lineare Diskriminanzanalyse (LDA). Bei der LDA wird die Varianz innerhalb der einzelnen Gruppen minimiert, während die Varianz zwischen den Gruppen maximiert wird. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass zusätzlich zur Einteilung neuer Daten in verschiedene bekannte Klassen auch Informationen erhalten werden, auf welchen Merkmalen die Unterscheidung beruht. Wird diese Methode auf Mikrobenspektren angewendet, ermöglicht dies umgekehrt Rückschlüsse auf die biochemischen Unterschiede zwischen den Zellen.

Die Vorteile der Raman-Spektroskopie und ihrer Kombination mit chemometrischen Methoden sollen in dieser Arbeit genutzt werden, um die Auswirkungen negativer und positiver Umwelteinflüsse auf Mikroorganismen zu untersuchen. Dabei sollen sowohl ein nachteiliger Einfluss auf Bakterien als auch ein vorteilhafter Einfluss auf Pilze näher betrachtet werden. Im Folgenden wird auf den Forschungsstand zu beiden Themenbereichen näher eingegangen.

1.2 Stand der Forschung

Im Rahmen dieser Arbeit sollen ein negativer und ein positiver Umwelteinfluss untersucht werden. Der negative Einfluss „antibiotischer Stress“ wird dabei an Bakterien untersucht, die diesem Stress gezielt ausgesetzt werden, da dieses Szenario für die klinische Anwendbarkeit der Raman-spektroskopischen Bakterienidentifizierung von Bedeutung ist. Die Auswirkungen des positiven Einflusses „Nahrungsüberangebot“ werden an filamentösen Pilzen analysiert, die aufgrund ihrer Fähigkeit, hochungesättigte Lipide in großen Mengen zu akkumulieren, für die industrielle Gewinnung spezieller Fettsäuren von Interesse sind.

1.2.1 Identifizierung von Bakterien unter Stress

Eine ganze Reihe von äußeren Faktoren, die auf Mikroorganismen einwirken können, sind potentiell schädlich und verursachen Stress. Dies können natürliche Einflüsse wie Temperatur, pH oder Ionenkonzentrationen sein, aber auch biologische Komponenten wie beispielsweise Fressfeinde, Giftstoffe oder wachstumshemmende Stoffe, welche von anderen Organismen abgegeben werden oder in der Umgebung vorhanden sind. So zählen etwa in der Lebensmittelindustrie verwendete Konservierungsstoffe wie Säuren (Essig, Zitronensäure) oder Salze (Acetate, Pökelsalz) in höheren Konzentrationen zu den wachstumshemmenden Substanzen. Die bekanntesten wachstumshemmenden Stoffe, die von Mikroorganismen abgegeben werden, sind die Antibiotika. Da diese sehr vielfältig sind und in ihrer Wirkungsweise sehr unterschiedlich sein können, soll im Folgenden ein Überblick über verschiedene Klassen von Antibiotika und ihre Wirkmechanismen gegeben werden.

Antibiotika und ihre Wirkungsweise

Unter Antibiotika versteht man Substanzen und Verbindungen, die das Wachstum und die Vermehrung von Bakterien behindern. Antibiotika können bakteriostatisch oder bakterizid wirken. Das bedeutet, sie können die Bakterien entweder in ihrem Wachstum hemmen, diese können aber weiter wachsen, sobald das Antibiotikum verschwunden ist. Oder sie können die Bakterien tatsächlich abtöten.

Heutzutage gibt es eine sehr große Anzahl von Antibiotika, die an unterschiedlichsten Stellen der Bakterienzelle angreifen und ihre Wirkung entfalten können.[9, 23] Daher werden Antibiotika auch oft anhand ihres Wirkmechanismus klassifiziert. Eine andere Version der Einteilung ist die nach ihrer chemischen Struktur. Diese bedingt aber oft die Wirksamkeit, daher sind beide Klassifikationsarten einander sehr ähnlich. Einige Klassen sollen im Folgenden vorgestellt werden.

Störung der Zellwandsynthese Als äußerste Schicht besitzen Bakterien eine Zellwand. Diese ist aus Peptidoglycanketten, aufgebaut, welche durch kurze Peptidketten miteinander verknüpft werden. Dieses sogenannte Murein-Netz besitzt eine hohe mechanische Festigkeit und stabilisiert die Zelle. Ohne diese mechanische Stabilisierung könnte die Zelle dem hohen osmotischen Druck des Cytoplasmas nicht standhalten. Wasser würde unkontrolliert in die Bakterienzelle eindringen, diese ausdehnen und schließlich zum Platzen bringen. Antibiotika, welche die Zellwandsynthese stören, behindern meist die Vernetzung der einzelnen Peptidoglycanketten und verringern dadurch die Festigkeit der Zellwand.

β -Lactam-Antibiotika Die wohl bekannteste Gruppe der Antibiotika sind die β -Lactame. Deren bekannteste Vertreter ist das Penicillin, es gibt aber auch eine große Gruppe von Derivaten wie Aminopenicilline, zu denen das Ampicillin zählt, Carbapeneme und Cephalosporine. Antibiotika dieser Gruppe binden irreversibel an Enzyme, welche die Murein-Ketten der Zellwand miteinander vernetzen. Daher können die Bakterien dem osmotischen Druck nicht mehr so gut standhalten und platzen schließlich.

Glycopeptide wie Vancomycin verhindern die Verlängerung der Mureinketten in der Zellwand und deren Quervernetzung. Dadurch sinkt die Stabilität der Zellwand und das Bakterium ist wie bei den β -Lactam-Antibiotika einem unkontrollierten Wasser-Einfluss durch den hohen osmotischen Druck ausgesetzt, der es schließlich platzen lässt.

Störung der DNA-Replikation Die DNA ist der Informationsspeicher der Zelle. Sie muss vor der Zellteilung repliziert werden und wird auch für die Synthese von Proteinen abgelesen. Am Replizieren und Ablesen der DNA sind eine ganze Reihe von Enzymen beteiligt. Die Gruppe der Topoisomerasen beseitigt Verdrillungen in der DNA. Anschließend können Polymeraseenzyme an die einzelnen DNA-Stränge binden und an ihnen entlang neue DNA oder mRNA synthetisieren, indem sie die einzelnen DNA-Bausteine komplementär zum vorhandenen Strang zusammenfügen.

Chinolone behindern die DNA-Replikation, indem sie verschiedene Topoisomerasen hemmen. Ciprofloxacin beispielsweise hemmt das Enzym Gyrase, welches die Verdrillung der DNA-Doppelhelix in der Replikationsgabel beseitigt. Zur Gruppe der Chinolon-Antibiotika gehören unter anderem Ciprofloxacin, Moxifloxacin und Norfloxacin.

Sulfonamid-Antibiotika wie Sulfamethoxazol oder Trimethoprim greifen in den Folsäure-Metabolismus der Bakterienzellen ein. Folsäure ist ein wichtiger Cofaktor bei der Purin-Basen-Herstellung. Sulfonamide hemmen daher indirekt die DNA-Replikation, indem sie die Synthese der dafür nötigen Bausteine behindern.

Störung der Proteinbiosynthese Bei der Proteinbiosynthese werden die genetischen Informationen in Aminosäure-Abfolgen übersetzt. Dazu lagern sich Ribosomen an der mRNA an, binden die zur mRNA-Sequenz passende tRNA, welche eine definierte Aminosäure trägt, und verknüpfen die von der tRNA gelieferte Aminosäure mit der bereits gebildeten Aminosäurekette. Die nun Aminosäure-freie tRNA verlässt das Ribosom und letzteres rückt einen Schritt weiter auf die nächste Lese-Position, um die nächste tRNA binden zu können. An jeder Stelle dieses Prozesses können Antibiotika in die Synthese eingreifen.

Aminoglycoside wie beispielsweise Gentamicin oder Streptomycin binden an die Ribosomen und führen dazu, dass die mRNA nicht korrekt abgelesen wird und Stopp-Signale überlesen werden. Dadurch entstehen fehlerhafte und zu lange Proteine.

Polyketide wie Tetracycline und Makrolidantibiotika wirken ebenfalls an den Ribosomen. Tetracycline wie Doxycyclin blockieren den Bindungsplatz der tRNA. Dadurch kann keine neue tRNA am Ribosom binden und die Verlängerung der Proteinkette wird gestoppt. Makrolidantibiotika wie Erythromycin verhindern, dass das neu synthetisierte Protein das Ribosom verlässt. Dies stoppt die Proteinsynthese, nachdem lediglich eine kurze Proteinkette synthetisiert wurde.

Störung der Zellmembran Einige Antibiotika haben ihren Wirkort in der Zellmembran. Dazu gehören die Polypeptid-Antibiotika. Sie stören beispielsweise die Integrität der Membran durch Veränderungen ihrer Permeabilität oder Porenbildung und verhindern Transportprozesse.

Wie aus dieser Übersicht bereits zu erkennen ist, können Antibiotika eine Bakterienzelle auf vielfältige Weise in ihrem Wachstum hemmen oder sie abtöten. Darüber hinaus wirken manche Antibiotika besonders gut auf eine spezielle Gruppe von Bakterien, zum Beispiel β -Lactam-Antibiotika auf Gram-positive Bakterien. Andere, wie beispielsweise Fluorochinolone, wirken eher unspezifisch auf alle Arten von Bakterien. Die Anwesenheit von antibiotischen Substanzen in einer Bakterienprobe kann daher bei deren Untersuchung unterschiedliche Auswirkungen auf die Identifizierung der Bakterien haben. Daher soll dieser Einfluss für verschiedene Identifizierungsmethoden genauer betrachtet werden.

Einfluss von Antibiotika auf bakterielle Identifizierungsmethoden

Soll eine Mikrobengemeinschaft untersucht und ihre Mitglieder identifiziert werden, muss der Effekt (potentiell) vorhandener Wachstumshemmer berücksichtigt werden. Jedwede mikrobielle Vermehrung, die unter Antibiotika-Einfluss stattfindet, ist zu Gunsten oder zu Ungunsten bestimmter Mikroben verschoben. Dies kann zum Bei-

spiel Auswirkungen haben, wenn eine Umweltprobe untersucht und die enthaltenen Mikroorganismen bestimmt werden sollen. Aber natürlich auch, wenn eine Probe von einem erkrankten Menschen auf Bakterien untersucht wird. Um zu verstehen, welche Auswirkungen Antibiotika in diesen Fällen haben, sollen im Folgenden wichtige Methoden zur Bestimmung von Mikroorganismen und ihre Beeinflussung durch Antibiotika näher vorgestellt werden.

Konventionelle mikrobiologische Identifizierung Die am häufigsten angewendete Methode der Identifizierung von Mikroorganismen ist die konventionelle mikrobiologische Analyse, die auf verschiedenen Wachstumsexperimenten basiert. Dabei werden in einem ersten Schritt die in einer Probe vorhandenen Mikroorganismen auf geeigneten Nährmedien kultiviert und anschließend isoliert. Diese Isolate werden dann in Form und Aussehen charakterisiert, sowohl makroskopisch über die Form und Farbe der Kolonien als auch mikroskopisch über die Form und Aufbau der einzelnen Zellen. Auch werden mit diesen reinen Kulturen weitere Tests auf morphologische, physiologische und biochemische Fähigkeiten unternommen. Dazu gehören beispielsweise die Gram-Färbung, die Fähigkeit der Sporenbildung, die Fähigkeit, bestimmte Substrate zu verwerten oder das Vorhandensein spezieller Enzym-Aktivitäten. Die Kombination aus allen bestimmten Merkmalen ermöglicht dann zum Schluss die Identifizierung des Organismus.[24] Diese mikrobiologische Analyse ist vergleichsweise einfach durchführbar und nicht besonders teuer. Allerdings ist sie langwierig, da durch die wiederholt nötigen Kultivierungsschritte für die Gewinnung von Reinkulturen und deren anschließende Testung mehrere Tage (bei langsam wachsenden Bakterien sogar Wochen) vergehen können, bis ein Mikroorganismus identifiziert ist.

Sind in einer solchen Probe nun antibiotisch wirksame Substanzen vorhanden, so werden je nach deren Wirkmechanismus alle oder selektiv bestimmte Bakterien in ihrem Wachstum gehemmt. Das bedeutet, dass diese Organismen bereits bei dem ersten Schritt der Bestimmung, der Isolierung, nicht auf dem Nährmedium wachsen werden und dementsprechend nicht isoliert werden können. Dies führt dazu, dass bei der Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft nicht alle Mitglieder erkannt und benannt werden und dass ein verfälschtes Bild deren Häufigkeit einzelner Organismen in der Probe entsteht. Für Umweltproben entspricht das einer unvollständigen und ungenauen Erfassung der vorhandenen Mikroflora. Für erkrankte Patienten bedeutet es im schlimmsten Fall, dass der Krankheitserreger nicht gefunden wird und daher nicht gezielt behandelt werden kann. Daher gibt es zahlreiche Versuche, Mikroorganismen mit anderen Methoden zu identifizieren.

MALDI-TOF Eine vergleichsweise neue Methode der Identifizierung von Mikroorganismen ist die massenspektrometrische Untersuchung mittels MALDI-TOF (eng-

lisch *matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight*, Matrix-unterstützte Laser-Desorptions-Ionisation gekoppelt mit Flugzeitdetektion). Dabei wird eine kleine Probemenge der Organismen mit Hilfe von Laserstrahlung ionisiert und das erhaltene Ionen-Muster mit einer Datenbank bereits analysierter Referenz-Organismen verglichen. Dank statistischer Methoden kann bestimmt werden, ob der Keim in der Probe mit einem in der Datenbank hinterlegten Organismus übereinstimmt und dadurch identifiziert ist.[25, 26] Diese Methode ist inzwischen so ausgereift, dass die Bakterien nicht mehr aus dem Medium isoliert werden müssen, sondern direkt in komplexer Matrix wie Blut [27, 28] oder Urin [29] identifiziert werden können.

Ein Nachteil der MALDI-TOF-Analyse ist, dass die Bestimmung nur zuverlässig ist, wenn in der Probe lediglich eine Sorte von Bakterien vorhanden sind. Zwei oder mehr in der Probe enthaltene Arten sind meist nicht gleichzeitig sicher identifizierbar. Häufig wird dann nur der vorherrschende Keim erkannt oder es findet gar keine zuverlässige Zuordnung mehr statt.[27, 30, 31]

Bedingung für die Identifizierung mittels MALDI-TOF ist dennoch die Verfügbarkeit einer genügend großen Anzahl an Bakterien. In manchen Fällen ist bereits eine ausreichende Menge in der Probe selbst vorhanden. Dies kann beispielsweise bei Urinproben von Patienten mit Harnwegsinfekten der Fall sein. Die Bakterien in derartigen Proben können direkt mittels MALDI-TOF identifiziert werden.[29] Im Allgemeinen jedoch wird die benötigte Menge von etwa 10^4 bis 10^6 Zellen [26] durch Kultivierung gewonnen. Dabei sind im Vergleich zur herkömmlichen mikrobiologischen Identifizierung deutlich kürzere Wachstumszeiten möglich, da nur vergleichsweise geringe Probemengen benötigt werden und lediglich einmalig kultiviert werden muss. Die Identifizierung mittels MALDI-TOF bietet daher gegenüber der mikrobiologischen Methode den Vorteil der Zeitersparnis. Dies ist vor allem im medizinischen Bereich von Interesse, wenn eine schnelle akkurate Bestimmung des Erregers nötig ist. Dennoch bestehen bei dieser Methode der Identifikation ähnliche Probleme wie bei der konventionellen mikrobiologischen Analyse, sobald ein Wachstumsschritt nötig ist und eine antibiotische Substanz in der Probe vorhanden ist.

Beide bisher beschriebenen Methoden setzen eine Kultivierbarkeit der zu untersuchenden Organismen voraus. Sie sind dementsprechend in ihrer Anwendbarkeit deutlich eingeschränkt, sobald Antibiotika im Medium vorhanden sind. Darüber hinaus ist ein Großteil der existierenden Bakterien und Pilze generell, auch in Abwesenheit von Antibiotika, mit bisherigen Methoden nicht kultivierbar und kann daher auch nicht so bestimmt werden. Bei Umweltproben lassen sich oft weniger als 1% der enthaltenen Mikroorganismen überhaupt kultivieren.[24] Daher besteht Forschungsbedarf, um auch diese Mikroorganismen kultivierungsunabhängig untersuchen und identifizieren zu können.

Polymerasekettenreaktion – PCR Eine Methode der Identifizierung, die gegebenenfalls auch gänzlich ohne Vervielfältigung der Bakterien durch Kultivierung auskommt, ist die Polymerasekettenreaktion (PCR, englisch *polymerase chain reaction*). Dabei wird das Genom von in der Probe vorhandenen Mikroorganismen mehr oder weniger gezielt vervielfältigt und detektiert [32] und kann anschließend sogar weitergehend untersucht werden, beispielsweise durch Massenspektrometrie [33] oder Sequenzierung. Die DNA-Sequenz ist unabhängig von den Wachstums- und Umweltbedingungen und damit (abgesehen von zufälligen Mutationen) ein stabiler Identifikationsparameter. Dementsprechend ist die PCR die Methode der Wahl, um unklare Identifizierungen zu bestätigen. Da sie prinzipiell auch an einzelnen Zellen durchführbar ist,[34, 35] wird das Ergebnis nicht durch das Vorhandensein antibiotischer Substanzen beeinflusst.

Die PCR ist jedoch gleichzeitig auch eine Methode, die vergleichsweise schwierig in der Durchführung und sehr fehleranfällig ist.[32] So gibt es eine ganze Reihe von Substanzen, welche die PCR stören, beispielsweise indem sie die dabei eingesetzten Enzyme hemmen. Diese Substanzen müssen vor der eigentlichen Kettenreaktion aus der Probe entfernt werden, was nicht immer ganz einfach ist. Vorhandene Antibiotika können möglicherweise solche Störsubstanzen sein und dementsprechend die Analyse erschweren. Auch viele der für die PCR nötigen Arbeitsschritten können zu fehlerhaften Ergebnissen führen, beispielsweise die DNA-Extraktion aus der Probe oder die Wahl der Reaktionstemperaturen und der nötigen Primer. Zusätzlich muss bei der PCR besonders sauber gearbeitet werden, damit die Probe nicht mit DNA von Fremdorganismen kontaminiert wird. Daher ist die PCR zwar eine sehr genaue Identifizierungsmethode, die aber vergleichsweise fehleranfällig ist. Für Routineanwendungen ist jedoch ein Verfahren notwendig, das möglichst einfach anzuwenden ist und robuste Ergebnisse ermöglicht.

Spektroskopische Bestimmung Eine weitere Möglichkeit, Bakterien ohne vorherige Vervielfältigung zu untersuchen, ist die Spektroskopie. Generell können sowohl IR-Absorptions- als auch Raman-Spektroskopie genutzt werden, um Mikroorganismen zu untersuchen.[36–39] Vielfältige Arbeiten in den letzten Jahren haben gezeigt, dass es möglich ist, Bakterien anhand ihrer Schwingungsspektren zu klassifizieren und auch unbekannte Proben zu identifizieren.[37, 38, 40–46]

Die Raman-Spektroskopie hat dabei der IR-Absorptions-Spektroskopie gegenüber einige Vorteile. Vorhandenes Wasser wirkt sich nicht störend aus, wodurch Untersuchungen an ungetrockneten, lebenden Bakterien möglich sind und auch direkt bakterielle Suspensionen untersucht werden können. Auch gibt die Raman-Spektroskopie meist gut aufgelöste Banden, wogegen IR-Spektroskopie breite Banden liefert, die oft erst nach Anwendung verschiedener die Auflösung verbessernder Techniken un-

terschieden werden können.[39] Der entscheidende Vorteil ist jedoch, dass bei der Raman-Spektroskopie die zur Messung verwendete Anregungswellenlänge weitgehend frei wählbar ist (siehe Kapitel 1.1). Dies ermöglicht zum Einen eine gewisse Auswahl, welche Bestandteile der Probe zum Spektrum beitragen, zum Anderen ist durch die Wahl der Anregungswellenlänge im sichtbaren Bereich eine höhere räumliche Auflösung möglich als bei Verwendung von IR-Licht. Bei Verwendung geeigneter Objektive kann der Laser auf eine Dimension fokussiert werden, die etwa der Größe einzelner Bakterienzellen entspricht (siehe Abbildung 1.1 in Kapitel 1.1). Dadurch ist es möglich, trotz des intrinsisch schwachen Raman-Signals Spektren guter Qualität von einzelnen Bakterienzellen zu erhalten. So entfällt die Notwendigkeit der Bakterienkultivierung, um genügend Biomasse für eine Untersuchung zu gewinnen. Die Raman-Spektroskopie ermöglicht also prinzipiell eine kultivierungsfreie Analyse von einzelnen Bakterienzellen. Dementsprechend verhindern vorhandene Antibiotika nicht von vornherein den Einsatz dieser Methode.

Durch die Verwendung geeigneter chemometrischer Verfahren (siehe Kapitel 1.1) werden auch geringe Variationen in diesen Spektren erkannt und ermöglichen die taxonomische Identifizierung einzelner Bakterienzellen anhand ihrer Raman-Spektren. Doch nicht nur zwischen verschiedenen taxonomischen Gruppen gibt es spektrale Unterschiede, die ausgewertet werden können. Da bei der Raman-spektroskopischen Untersuchung alle Moleküle, die sich im Fokus des Lasers befinden, zum Spektrum beitragen, ist das Resultat gewissermaßen eine Momentaufnahme der aktuellen Zellzusammensetzung. Diese kann in Abhängigkeit äußerer Einflüsse variieren. Für verschiedene Einflüsse wurde bereits gezeigt, dass die Raman-Spektroskopie eine geeignete Methode ist, um diese Einflüsse zu detektieren und zu quantifizieren.

Eine sehr deutliche Änderung der biochemischen Zusammensetzung einer bakteriellen Zelle ist die Bildung und Einlagerung von Speicherstoffen. In verschiedenen Studien und auch in dieser Arbeit wurden unterschiedliche Speicherstoffe wie Lipide [47, 48] oder Calcium-Dipicolinat [49, 50] in intakten Mikroorganismen spektroskopisch detektiert. In anderen Studien konnte belegt werden, dass sich die Wachstumsphase, in welcher sich eine Bakterienkultur befindet, anhand ihrer Raman-Spektren bestimmen lässt.[51–54] Die Zusammensetzung des Mediums und die Wachstumstemperatur beeinflussen ebenfalls die biochemische Zusammensetzung der Bakterien und dementsprechend deren Spektren.[55] Auch wurde gezeigt, dass innerhalb von Kolonien auf einer Agarplatte spektroskopisch detektierbare Unterschiede zwischen Bakterien im Zentrum der Kolonie und denen am Rand bestehen,[56] beispielsweise auch im Gehalt von β -Carotin.[57]

Natürlich haben auch verschiedene Formen von Stress, dem die Bakterien ausgesetzt sind, einen Einfluss auf die biochemische Zusammensetzung der Bakterien. Beispielsweise ändern der Einfluss von Hitze oder oxidierenden Substanzen die Raman-

Spektren von Bakterien.[58, 59] Allerdings können diese Änderungen auch durch thermische Denaturierungsprozesse oder chemische Reaktionen zustande kommen. Auch Schwermetalle in erhöhten Konzentrationen sind ein Stressfaktor für Mikroben. In einer Studie über den Einfluss von Schwermetallionen auf Bakteriensporen wurden spektroskopische Unterschiede bei An- und Abwesenheit von Schwermetallen beobachtet.[49] Sogar die Konzentration der Metallionen lässt sich durch ihre Auswirkungen auf die Spektren bestimmen, wie am Beispiel von *Streptomyces* unter Nickel-Einfluss gezeigt werden konnte.[60]

Ein weiterer Stressor sind Antibiotika, die auch in dieser Arbeit untersucht werden. Es wurde bereits nachgewiesen, dass sich die Raman-Spektren von Bakterien ändern, sobald sie mit einem Antibiotikum behandelt werden.[52, 53, 61, 62] Dabei wurden auch dosisabhängige Veränderungen der Raman-Spektren beobachtet.[52, 61, 62] Selbst der Angriffspunkt eines Antibiotikums konnte spektroskopisch untersucht werden.[61] In diesen Untersuchungen wurde allerdings nur eine einzige Bakterienart und deren Reaktion auf je ein Antibiotikum untersucht. Bisher ist nichts darüber bekannt, wie groß diese Variationen innerhalb einer Spezies im Vergleich zu den Unterschieden zwischen verschiedenen Bakterienarten sind. Die Anwendbarkeit der Raman-spektroskopischen Identifikation auch für Bakterien unter Antibiotikaeinfluss hängt jedoch stark davon ab, in welchem Ausmaß das Antibiotikum die Zellzusammensetzung und damit das Spektrum ändert.

Dieser wichtige Punkt sollte daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Dazu wurden Bakterien verschiedener Gattungen mit mehreren Antibiotika behandelt. Um eine möglichst allgemeine Aussage treffen zu können, wurden verschiedene Antibiotika in die Studie aufgenommen, deren Auswahl von ihrem Wirkmechanismus bestimmt wurde. Es wurde je ein Antibiotikum verwendet, das die Zellwandsynthese, die Proteinbiosynthese, die DNA-Replikation und die Synthese von DNA-Bausteinen hemmt. Ziel der Untersuchungen war, den Antibiotika-Einfluss in Relation zur Artenspezies-Variation zu setzen. Deshalb wurden mit chemometrischen Methoden Modelle erstellt, welche sowohl behandelte als auch unbehandelte Bakterien identifizieren sollten. Dafür wurden bei einem Teil der Modelle auch Spektren behandelter Bakterien verwendet, um den antibiotischen Stress zu repräsentieren. Auch der Einfluss der Antibiotika-Konzentration auf die Identifikationsgenauigkeit wurde untersucht.

Neben dem negativen Einfluss „antibiotischer Stress“, dem Bakterien ausgesetzt sein können, gibt es natürlich auch positive Umweltfaktoren. In dieser Arbeit wird beispielhaft das Überangebot von Nährstoffen untersucht.

1.2.2 Lipide als Speicherstoffe in Pilzen

Mikroorganismen sind zum Überleben auf die ausreichende Verfügbarkeit von Nährstoffen angewiesen. Es kann jedoch auch vorkommen, dass zeitweise zu wenig oder gar keine Nährstoffe in ihrem Lebensraum vorhanden sind. Eine Vielzahl von Mikroorganismen hat deshalb die Fähigkeit entwickelt, wichtige Ressourcen zu speichern. Derartige Speicherstoffe werden gebildet, wenn ein einzelner Nährstoff im Überangebot vorhanden ist, das entsprechende Wachstum durch das Fehlen anderer Nährstoffe jedoch eingeschränkt wird.[24, 63–65] Besonders oft finden sich Energie- und Kohlenstoff-Speicherstoffe. Von einigen Schwefelbakterien ist beispielsweise bekannt, dass sie elementaren Schwefel einlagern, den sie bei Bedarf zur Energiegewinnung heranziehen können.[24, 66]

Weitaus verbreiteter sind jedoch Speicherstoffe, die aus Primärmetaboliten bestehen. In Abbildung 1.2 sind die chemischen Strukturen einiger Speicherstoffe beispielhaft gezeigt. Einige Bakterien nutzen als Kohlenstoff- und Energiespeicher Polysaccharide in Form von Stärke (Abbildung 1.2A) oder Glykogen,[24, 63, 67] die als Körnchen (Granalien) in der Zelle eingelagert werden. Bei Abwesenheit äußerer Quellen oder bei erhöhtem Energiebedarf, beispielsweise während der Sporulation, werden diese Speicherkörner wieder verbraucht.[67]

Besonders weit verbreitet sind Lipide als Speicherstoffe. Sie bieten gegenüber Polysacchariden und Proteinen einige Vorteile. Da sie hydrophob und somit wasserunlöslich sind, lagern sie sich automatisch zu Granalien oder Vesikeln zusammen. Darüber hinaus haben sie einen höheren Energiegehalt, wodurch mehr Energie bei gleichem Raumbedarf gespeichert werden kann.[64]

Wachse (Abbildung 1.2B) gehören als Ester langkettiger Fettalkohole mit Fettsäuren zwar zu den Lipiden, werden jedoch eher selten als Speicherstoff gebildet, beispielsweise von *Acinetobacter spp.* oder *Alcanivorax borkumensis*.[64, 68]

Eine Gruppe von Lipiden, die deutlich öfter und besonders von Bakterien produziert wird, sind Polyhydroxyalkanoate (PHA, Abbildung 1.2C), welche als Einschlüsse in der Zelle erkennbar sind. Das häufigste da einfachste PHA ist Polyhydroxybutyrat (PHB).[48] Bis zu 80% der Trockenmasse einer Zelle können aus solchen PHA bestehen.[69]

Als natürliche Polymere sind PHA auch von industriellem Interesse, da sie ähnliche Eigenschaften wie erdölbasierte Kunststoffe besitzen. Dabei variieren die Eigenschaften der PHAs in Abhängigkeit von den Monomeren, wobei auch verschiedene Bausteine in den Ketten verknüpft sein können.[65, 70, 71] Durch gezielten Variation der Monomere, ihrer Seitenketten und der Abfolge verschiedener Monomere in der Kette können so Polymere mit völlig unterschiedlichen Eigenschaften von hart und starr bis elastisch hergestellt werden.[70] Dies und die Tatsache, dass PAH thermoplastisch

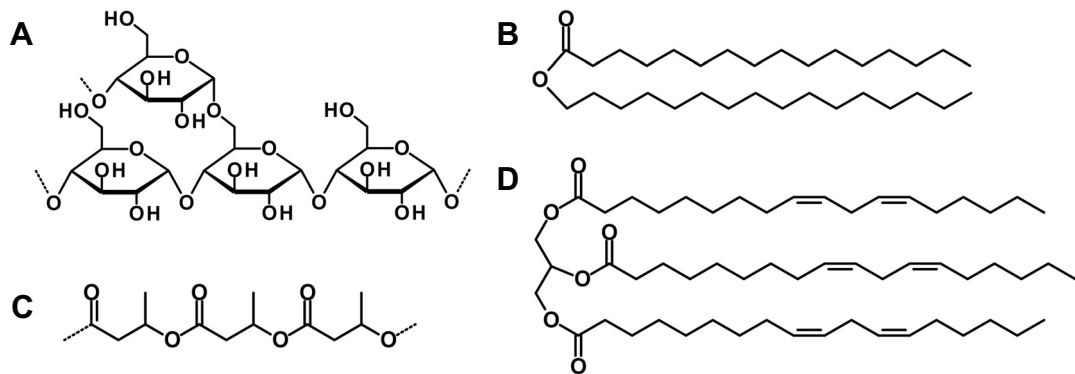


Abbildung 1.2: Chemische Strukturen verschiedener mikrobieller Speicherstoffe: A Stärke, B Wachs, C Polyhydroxyalkanoat, D Triglycerid.

und dadurch formbar sind, macht sie zu einem interessanten Rohstoff für biologisch abbaubare Plastikprodukte. Der Einsatz genetisch manipulierter Mikroorganismen erlaubt sogar die Biosynthese nicht-natürlicher PHA.[65, 71] Dies hat zu einer Reihe von Anstrengungen geführt, gezielt PHA mit speziellen Eigenschaften biosynthetisch herzustellen, wie zahlreiche Übersichtsartikel der letzten Jahre zeigen.[65, 70, 71]

Mikrobielle Triglyceride

Eine dritte große Gruppe der Lipid-Speicherstoffe in Mikroorganismen sind die Triglyceride (Abbildung 1.2D). Sie werden auch oft als Einzelzell-Öle (SCO, englisch *single cell oils*) bezeichnet. Dabei werden Mikroorganismen, bei denen der Anteil der Lipide an der Trockenmasse mehr als 20% beträgt, als ölginös bezeichnet.[72, 73] Die Zusammensetzung der SCO ist abhängig vom jeweiligen Organismus und sehr unterschiedlich. Sie kann sich deutlich von der Zusammensetzung tierischer oder pflanzlicher Öle und Fette unterscheiden. Sowohl in pflanzlichen als auch in tierischen Ölen findet sich stets ein breites Spektrum verschiedener gesättigter und ungesättigter Fettsäuren. Aus ernährungsphysiologischer Sicht sind dabei die mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFAs, englisch *polyunsaturated fatty acids*) von besonderem Wert. Sie können von den meisten Tieren nicht selbst *de novo* synthetisiert werden, dienen aber im Körper als Vorstufe für eine Vielzahl von Signal- und Botenstoffen. Daher gelten sie als essentielle Fettsäuren und müssen mit der Nahrung aufgenommen werden. Die chemischen Strukturen einiger dieser Fettsäuren sind in Abbildung 1.3 gezeigt.

Besonders reich an essentiellen Fettsäuren sind Fischöle, die im Gegensatz zu Pflanzenölen auch besonders lange Fettsäuren mit vielen Doppelbindungen wie beispielsweise Arachidonsäure (ARA, englisch *arachidonic acid*, C20:4, ω 6), Eicosapentaensäure (EPA, englisch *eicosapentaenoic acid*, C20:5, ω 3) oder Docosahexaensäure (DHA, englisch *docosahexaenoic acid*, C22:6, ω 3) enthalten (siehe Abbildung 1.3),

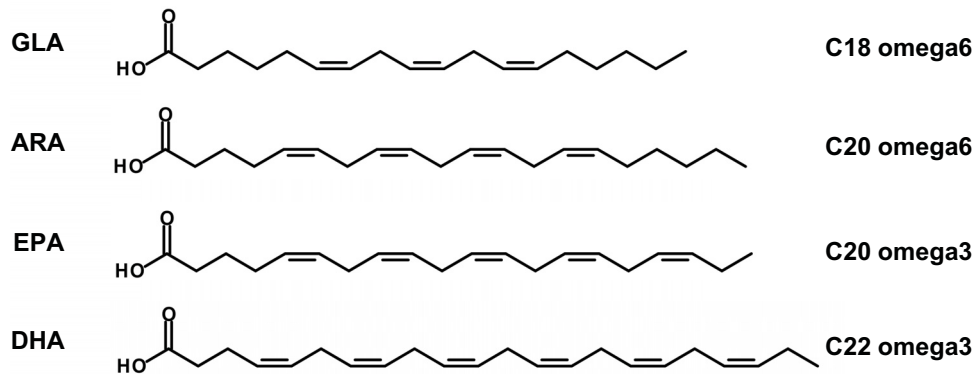


Abbildung 1.3: Chemische Strukturen wichtiger PUFAs: GLA γ -Linolensäure, ARA Arachidonsäure, EPA Eicosapentaensäure, DHA Docosahexaensäure.

die sie mit ihrer Nahrung aufgenommen haben. Der Gehalt dieser hochungesättigten Fettsäuren (HUFAs, englisch *highly unsaturated fatty acids* im Fischöl variiert dabei abhängig von der Fischart, deren Futter und sogar der Jahreszeit, zu welcher der Fisch gefangen wurde.

Auf der anderen Seite besteht an PUFAs ein vielfältiges Interesse. Da sie im Körper als Vorstufen wichtiger Signalmoleküle dienen, müssen sie in ausreichender Menge mit der Nahrung zugeführt werden. Besonders bei Säuglingen ist eine genügende Versorgung mit ARA und DHA wichtig, da diese Fettsäuren für die Nervenentwicklung unentbehrlich sind.[72, 74–76] Diese Erkenntnisse haben dazu geführt, dass Milchpulver für die Säuglingsernährung oft mit diesen Fettsäuren angereichert werden. Auch für Erwachsene wird die gezielte Gabe von PUFAs als Nahrungsergänzungsmittel und zu medizinischen Zwecken diskutiert.[72, 76]

Für eine ganze Reihe von Erkrankungen wurde eine positive Wirkung durch die gezielte Gabe von PUFAs und besonders die Gruppe der ω 3-PUFAs dokumentiert. Besonders gut dokumentiert ist die positive Wirkung von PUFAs bei Gefäßerkrankungen wie Arteriosklerose und Herzinfarkt.[72, 76–78] Bei letzterem werden PUFAs gezielt als Therapeutikum bei Infarktpatienten verwendet, um Folgeschäden und erneuten Infarkten vorzubeugen.[79]

Die antiinflammatorischen Eigenschaften der ω 3-PUFAs werden bei der Behandlung von Ekzemen genutzt. Auch die Symptome verschiedener Autoimmunerkrankungen wie chronisch entzündlichen Darmerkrankungen oder multiple Sklerose können durch PUFA-Gabe gebessert werden.[77, 80] Daneben gibt es Hinweise, dass ω 3-PUFAs positive Effekte bei Diabetes-Behandlung haben.[77] PUFAs haben auch eine gewisse Schutzwirkung vor bestimmten Krebsarten gezeigt.[77] γ -Linolensäure (GLA, englisch *γ -linolenic acid*, C18:3, ω 3) und EPA wurden darüber hinaus bereits zur unterstützenden Behandlung bei Krebs erfolgreich eingesetzt.[76, 81] Sogar bei neu-

rologischen Erkrankungen wie Depressionen oder Schizophrenie können die Symptome durch PUFA-Gabe gemildert werden.[77] Auch eine protektive Wirkung vor neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer wird diskutiert.[72]

Auch bei der Behandlung von Sepsis-Patienten können PUFAs von Nutzen sein. Studien haben gezeigt, dass die Gabe großer Mengen PUFA-reicher Lipide hilft, Organversagen zu vermeiden und so das Fortschreiten der Erkrankung zu schwerer Sepsis oder septischen Schock zu verhindern.[82]

Außerhalb der Medizin werden PUFAs beispielsweise für die Herstellung kosmetischer Produkte verwendet.[83–85]

Für eine solch vielfältige Verwendung von PUFAs besteht dementsprechend ein großer Bedarf an PUFA-reichen Lipiden. Dieser ist durch die bisherigen Quellen jedoch kaum zu decken, da sie in Pflanzenölen nur in relativ geringen Mengen vorkommen und Fischöle nicht in beliebiger Menge gewonnen werden können.[86] Eine Alternative können hier SCO sein. In SCO verschiedener Mikroorganismen lassen sich oft große Mengen dieser wichtigen PUFAs finden. So produziert die Mikroalge *Cryptocodinium cohnii* beispielsweise ein Öl, welches zwischen 40 und 50% DHA enthält, aber keine nennenswerten Mengen an anderen langkettigen PUFAs wie EPA.[72, 76] Pilze der Gattung *Mortierella* können ein SCO produzieren, das große Mengen ARA (50-70% der Fettsäuren) enthält.[72, 87]

Neben der Gewinnung wertvoller PUFAs können SCO darüber hinaus aber auch als Energiequelle genutzt werden. So könnten olaginöse Mikroorganismen beispielsweise direkt als Nahrungsergänzungsmittel oder Tierfutter genutzt werden.[86, 88] Weiterhin eignen sich SCO auch als Ausgangsstoffe zur Biodiesel-Produktion.[89, 90] Daher haben SCO produzierende Mikroorganismen in den letzten Jahren ein wachsendes Interesse erregt. Ein nicht zu unterschätzender Vorteil ist dabei, dass Mikroorganismen im Gegensatz zu Pflanzen unabhängig von Jahreszeiten jederzeit kultiviert werden können. Durch genetische Manipulation der Mikroorganismen, das gezielte Einbringen zusätzlicher Genfunktionen oder das Ausschalten vorhandener Gene lassen sich darüber hinaus auch gezielt Öle mit spezieller Zusammensetzung gewinnen.[86, 91]

SCO lassen sich aus allen Arten von Mikroorganismen isolieren: Bakterien, Hefen, Algen und Pilzen. Jede dieser Organismenklassen weist dabei gewisse Vorteile und Nachteile für die SCO-Produktion auf (siehe Tabelle 1.1).

Bakterien lassen sich beispielsweise besonders leicht kultivieren. Sie wachsen schnell, so dass innerhalb kürzester Zeit viel Biomasse erzeugt werden kann. Sie wären daher eine bevorzugte Wahl als SCO-Produzenten. Allerdings gibt es relativ wenige Bakterien, die Triglyceride als Speicherstoffe verwenden, da die meisten Bakterien stattdessen PAH produzieren.[72] Von den Bakterien, die SCO produzieren, stammen die meisten aus der Ordnung der Actinomycetales, beispielsweise *Streptomyces*

Organismen	Vorteile	Nachteile
Bakterien	sehr einfach zu kultivieren hohe Zelldichten	meist geringer Lipidgehalt der Biomasse geringer Anteil an PUFAs im SCO
Hefen	hohe Zelldichten hoher Lipidgehalt der Biomasse	geringer Anteil an PUFAs im SCO
Algen	hoher Lipidgehalt der Biomasse hoher Anteil an PUFAs im SCO	geringe Zelldichten Kultivierung im Photoreaktor erforderlich
Pilze	einfach zu kultivieren hohe Zelldichten hoher Lipidgehalt der Biomasse hoher Anteil an PUFAs im SCO	

Tabelle 1.1: Vor- und Nachteile der einzelnen Mikroorganismen als PUFA-Produzenten.

oder *Rhodococcus*. [64] Allerdings akkumulieren viele dieser Bakterien weniger als 30% SCO als Speicherstoff, [89] auch wenn für einzelne Stämme bis zu 87% Lipidgehalt in der Trockenmasse gefunden wurde. [92] Dieser Lipidgehalt ist für industrielle Zwecke oft zu gering. Auch ist die Zusammensetzung bakterieller SCO mit nur geringen Anteilen an PUFAs derjenigen pflanzlicher Lipide sehr ähnlich. [89, 93] Daher bietet die Gewinnung von SCO durch Bakterien keinen nennenswerten Vorteil gegenüber der Gewinnung herkömmlicher Öle aus Pflanzen oder Tieren. Darüber hinaus können einige der lipidproduzierenden Bakterien wie *Mycobacterium tuberculosis* pathogen sein. [64] Aus diesen Gründen sind bakterielle SCO bisher nicht von besonders großem Interesse.

Hefen lassen sich ähnlich leicht wie Bakterien kultivieren und erzeugen ebenfalls in kurzer Zeit viel Biomasse, die relativ hohe Anteile von Lipiden enthält. [89, 94, 95] In den SCO von Hefen dominieren jedoch ebenso wie bei Bakterien die gesättigten oder einfach ungesättigten Fettsäuren. Langkettige oder mehrfach ungesättigte Fettsäuren treten nur in sehr geringen Mengen auf. [72, 94–96] Sowohl Bakterien als auch Hefen sind daher für die Gewinnung von PUFAs und HUFAs nicht von Interesse. Ihr SCO ist jedoch potentiell für Biodiesel-Produktion verwendbar. [89]

Im Gegensatz zu Bakterien und Hefen können Mikroalgen große Mengen HUFAs synthetisieren. [72, 84, 89] Das Öl aus maritimen Algen kann zwischen 10 und 70%

DHA und 5 bis 18% Docosapentaensäure (C22:5, ω 3) enthalten.[84] Bis zu 75% der Trockenmasse kann aus SCO bestehen, jedoch liegt der Gehalt meist zwischen 30 und 40%.[84, 89, 94] Im Gegensatz zu anderen Mikroorganismen ist bei Algen die Kohlenstoffquelle nicht auch gleichzeitig die Energiequelle für die Zelle. Algen nutzen als Kohlenstoffquelle das Kohlendioxid der Luft. Dieses wird in Zucker umgewandelt, aus denen dann alle weiteren Biomoleküle in der Zelle synthetisiert werden. Die Umwandlung von Zuckermolekülen in Lipide als Speicherstoff ist jedoch energieaufwendiger als deren direkte Speicherung als Polysaccharide. Dementsprechend nutzen nur wenige Algen SCO als Speicherstoff, weit mehr speichern ihre Energie und Kohlenstoff als Polysaccharide. Da die Bildung von Speicherstoffen in jedem Falle aber nur stattfindet, wenn Kohlenstoff und Energie im Überfluss vorhanden sind, müssen Algenkulturen zur SCO-Gewinnung stets mit CO₂ versetzt werden, um eine nennenswerte Lipid-Produktion zu erreichen. Einen zweiten großen Nachteil stellt die Energiequelle dar, die für die phototrophen Algen in Form von Licht der Kultur zugeführt werden muss.[76, 89, 94] Das bedeutet, dass sie im Gegensatz zu anderen Mikroorganismen in speziellen Fotoreaktoren kultiviert werden müssen, die eine gleichmäßige Bestrahlung der Kulturlösung ermöglicht. Derartige Bioreaktoren sind sehr aufwendig und teuer.[94]

Auch stellen die von Algen gebildeten Lipide zum Teil eine komplexe Mischung aus Triglyceriden und anderen Lipidspezies dar,[76, 89] was die Aufarbeitung des SCO erschwert.[86, 94] Da sie darüber hinaus nicht so hohe Zelldichten wie andere Mikroorganismen erreichen, sind Mikroalgen hauptsächlich von Interesse für die Gewinnung besonders langkettiger Fettsäuren mit einer großen Anzahl von Doppelbindungen wie DHA oder EPA.

Die wohl größte Gruppe der SCO-Produzenten sind die Pilze. Sie können ähnlich wie Bakterien und Hefen in gängigen Bioreaktoren kultiviert werden und wachsen ebenfalls in kurzer Zeit zu großer Zelldichte heran. Dies ist wichtig, um viel Biomasse und damit viel SCO produzieren zu können. Die Menge an erzeugtem SCO hängt aber natürlich auch vom Lipidgehalt in der Biomasse ab. Auch bei Pilzen gibt es da deutliche Variationen im Lipidgehalt in Abhängigkeit von Gattung und Spezies, jedoch enthalten olaginöse Pilze häufig zwischen 30 und 50% SCO.[97, 98] In verschiedenen Experimenten wurden sogar zwischen 70 und 85% Lipidgehalt bestimmt.[87, 89, 99] Daher sind Pilze gute Bioreaktoren für die schnelle Produktion großer Mengen SCO.

Von besonderem Interesse ist die Lipidzusammensetzung. Diese ist bei Pilzen generell sehr variabel. Viele Pilz-Lipide zeichnen sich jedoch durch einen hohen Gehalt an PUFAs aus. Durch geeignete Wahl der Spezies lassen sich mit Pilz-Kulturen daher je nach Bedarf sowohl SCO mit besonders hohem PUFA-Gehalt als auch mit niedrigem PUFA-Gehalt gewinnen. Diese können dementsprechend sowohl für die Gewinnung spezieller PUFAs zu medizinischen Zwecken oder als Nahrungsergänzungsmittel als

auch für die Biodiesel-Produktion herangezogen werden.[76, 89, 93, 100]

Welche Fettsäuren in den Lipiden vorkommen, ist zum Teil taxonomisch bedingt. Während Ascomyceten und Basidiomyceten nur $\omega 3$ -Fettsäuren produzieren, kommen bei Oomyceten und Zygomyceten hauptsächlich Fettsäuren der $\omega 6$ -Gruppe vor.[87] In der Klasse der Zygomyceten befinden sich dabei besonders viele Lipid-Bildner.[86] In der Literatur werden am häufigsten Zygomyceten der Gattungen *Cunninghamella*, *Mucor* und *Mortierella* untersucht.[72, 76, 86, 87, 93, 100–107] Andere Pilze, deren SCO-Produktion und Zusammensetzung untersucht wurden, sind beispielsweise *Thamnidium*,[100] *Aspergillus* [100] oder *Lipomyces*. [96]

Nahezu für jede PUFA kann ein Pilz gefunden werden, der diese in größeren Mengen produziert. GLA kann zum Beispiel aus verschiedenen Spezies von *Cunninghamella*, *Mucor* oder *Mortierella*, Subgenus *Micromucor* gewonnen werden.[76, 86, 93, 100, 103, 106] *Mortierella*-Spezies sind weiterhin typische Quellen für ARA, da die Fähigkeit, ARA zu produzieren eines der Kriterien für die Zugehörigkeit zur Subgattung *Mortierella* ist.[87, 102, 106] Besonders *M. alpina* zeichnet sich durch hohen Gehalt von ARA im SCO aus.[76, 86, 87, 101, 104, 105, 107] Dieser liegt oft zwischen 30 und 50%, kann aber auch deutlich darüber liegen.[72, 87, 106] Aber auch andere HUFAs wie Dihomo- γ -Linolensäure [104] und EPA [76, 86, 105, 107] können aus *Mortierella* gewonnen werden.

Aufgrund der Möglichkeit, eine Vielzahl unterschiedlicher PUFAs aus ihrem SCO gewinnen zu können, haben Pilze der Gattung *Mortierella* eine besondere Aufmerksamkeit erfahren. Auch können sie ein breites Spektrum von Verbindungen als Kohlenstoffquelle nutzen, beispielsweise verschiedene Zucker,[73, 98, 108, 109] Acetat,[102, 110] und auch Glycerin.[73, 87, 100, 104, 110, 111] Diese Vielfalt an Substraten erleichtert ihre Kultivierung. Darüber hinaus sind *Mortierella* als Saprobionten in der Lage, auf einer Vielzahl von landwirtschaftlichen Reststoffen wie Pressrückständen von Birnen,[103] Sojabohnen [112] oder Senf,[112, 113] auf Lignocellulosesubstraten wie hydrolysiertem Stroh,[93, 109] Weizen- oder Reiskleie [93, 112, 114] oder auch auf Molke [93] unter Bildung von SCO zu wachsen. Dies ermöglicht potentiell die Aufwertung landwirtschaftlicher Rückstände, indem sie als preiswerte Nährmedien zur Kultivierung von *Mortierella*-Pilzen verwendet werden, um SCO zu gewinnen.

Analyse der Lipide

Um nicht nur Informationen über den Lipidgehalt in der biologischen Trockenmasse, sondern auch weitere Informationen über die Art der Lipide, enthaltene Fettsäuren oder den Sättigungsgrad zu gewinnen, ist eine Analyse der SCO nötig. Die gängigsten Methoden dafür sind chromatographische Trennprozesse. Dabei werden die Lipide mit einem geeigneten Lösungsmittel wie beispielsweise Methanol, Chloroform oder

n-Hexan oder einer Mischung davon aus dem geernteten Pilzmyzel extrahiert.[115, 116] Anschließend werden die Fettsäuren in ihre Silyl- [117] oder häufiger Methyl-ester überführt,[115] welche dann mittels Flüssigchromatographie,[118] Hochdruck-Flüssigchromatographie [119] oder Gaschromatographie (GC) voneinander getrennt, identifiziert und quantifiziert werden. Dabei wird die GC besonders häufig verwendet. Die Identifikation und Quantifikation der einzelnen Fettsäuren wird dabei durch den Vergleich mit Mischungen bekannter Lipide erreicht.[90, 114, 115, 120, 121] Dementsprechend können nur Substanzen quantitativ bestimmt werden, die in einer Referenz-Datenbank hinterlegt sind. Eine Ausnahme bildet die Kombination der GC mit einer massenspektrometrischen Untersuchung, die sogenannte GC-MS. Sie ermöglicht anhand des Massenspektrums die direkte Identifikation der Substanzen.[122, 123]

Durch den notwendigen Extraktionsschritt ist das Ergebnis der chromatographischen Analyse jedoch immer ein Mittelwert der Probe, der keine Aussage über die Lipidzusammensetzung in einzelnen Kompartimenten erlaubt. Es gibt jedoch auch andere Methoden der Lipid-Analytik, die eine orts aufgelöste Untersuchung der Lipide ermöglichen. Beispielsweise wurden die Lipide von einzelnen Mikroorganismen mit massenspektrometrischen Verfahren wie MALDI (englisch *matrix assisted laser desorption/ionization*, Matrix-unterstützte Laser-Desorptions-Ionisation) oder LESA-MS (englisch *lipid extraction surface analysis mass spectrometry*, Lipid-Extraktions-Oberflächenanalysen-Massenspektrometrie) untersucht.[124, 125] Ein Nachteil all dieser Methoden ist jedoch, dass die Probe durch die Analyse zerstört wird.

Eine alternative Methode der Lipidanalytik ist die Spektroskopie. Sowohl IR- als auch Raman-Spektroskopie sind bereits zur vielfältigen Untersuchung von Lipiden verwendet worden. Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass beispielsweise spektroskopisch bestimmt werden kann, ob ein pflanzliches Öl mit anderen Ölarten gemischt wurde. Oft kann dabei auch der Anteil der einzelnen Komponenten schnell und genau mittels Spektroskopie bestimmt werden.[17, 126–128] Auch Qualitätsparameter wie Sättigungsgrad/Iodzahl, Peroxidzahl, Azidität, Verseifungszahl und Gehalt an *trans*-Fettsäuren können mittels Schwingungsspektroskopie bestimmt werden.[128, 129] Sogar die Anzahl an Doppelbindungen pro Fettsäure,[130] der Anteil an freien Fettsäuren [131] oder in Einzelfällen die genaue Zusammensetzung des Lipids [122] konnten spektroskopisch untersucht werden.

Allerdings sind viele dieser Untersuchungen an reinen Ölen durchgeführt worden. Vom analytischen Standpunkt ist dies eine vergleichsweise einfache Fragestellung, da die Probe gut definiert und einheitlich ist. Bei der Untersuchung von Mikroorganismen ist die Zusammensetzung der Probe nicht mehr homogen und auch nur ungenau definiert. Bei der spektroskopischen Untersuchung von Mikroorganismen sind zusätzlich auch Einflüsse von anderen Zellbestandteilen wie Zellwand, Cytoplasma oder DNA zu erwarten. Diese können je nach ihrer Natur die spektroskopische Lipidanalytik

an Mikroorganismen erheblich beeinträchtigen. Aus diesen Gründen wurden bisher nur wenige spektroskopische Untersuchungen von SCO in den Lipid-produzierenden Organismen durchgeführt. Es gibt Ansätze, die Lipide in intakten Mikroalgen spektroskopisch zu analysieren.[121, 130, 132, 133]

SCO aus Pilzen jedoch wurden bisher weder als Extrakt noch im intakten Organismus spektroskopisch untersucht. Dabei eignet sich die Raman-Mikrospektroskopie durch ihren zerstörungsfreien Charakter und ihre hohe Ortsauflösung von unter $1\ \mu\text{m}$ sehr gut, um Lipid-Vesikel in intakten Pilzhyphen zu untersuchen. Zwar ist das Probenvolumen beim Untersuchen einzelner Vesikel sehr gering, durch die hohe Lipidkonzentration im Laserfokus können dennoch Spektren guter Qualität erhalten werden. Da außerdem Wasser nur ein schwaches Raman-Signal ergibt, muss die Probe nicht speziell vorbehandelt oder getrocknet werden, sondern kann im lebenden Zustand untersucht werden. In Kombination mit der Tatsache, dass die Probe bei spektroskopischen Messungen nicht zerstört wird, ermöglicht dies zeitaufgelöste Untersuchungen wie das Verfolgen von Wachstumsprozessen.

Die Vorteile der Raman-Spektroskopie sollen im Rahmen der vorliegenden Arbeit für die Untersuchung von Lipiden in olaginösen Pilzen genutzt werden. Als zu untersuchende Pilze wurden Vertreter der Gattung *Mortierella* gewählt, da sie eine besonders variable Lipidzusammensetzung haben und oft große Mengen SCO produzieren können. Da die Zusammensetzung der Pilzöle jedoch zu variabel ist, um eine Raman-spektroskopische Bestimmung der einzelnen enthaltenen Fettsäuren durchzuführen, soll lediglich ein Summenparameter bestimmt werden. Dazu bietet sich der Sättigungsgrad an, da er einer der wichtigsten Parameter zur Charakterisierung von Lipiden ist und sich darüber hinaus gut spektroskopisch bestimmen lässt, wie zahlreiche Veröffentlichungen zeigen.[120, 121, 130–132, 134–140]

Informationen über den Sättigungsgrad sind in den Intensitäten spezifischer Raman-Banden enthalten. Sind in einer Fettsäure Doppelbindungen vorhanden, so enthält das Spektrum dadurch Banden, die umso intensiver sind, je mehr Doppelbindungen das Lipid enthält. Werden nun die Intensitäten dieser Banden zu denen von Methylengruppen ins Verhältnis gesetzt, so ist dieses Verhältnis ein spezifisches Maß für den Sättigungsgrad. Durch Berechnen des Verhältnisses für bekannte Lipide aus deren Spektren kann so selbst eine quantitative Bestimmung des Sättigungsgrades erfolgen, wobei die Quantifizierung auf verschiedene Arten angegeben werden kann. So kann das spektroskopisch bestimmte Verhältnis zum Verhältnis von Methyl- und Methylengruppen in der Probe in Relation gesetzt werden. Ein anderes und in der Lipidanalytik häufiger verwendetes Maß des Sättigungsgrades ist die Iodzahl. Sie gibt an, wieviel Gramm Iod von 100 g einer Probe gebunden werden können, wobei die Bindung bei Fetten durch die Addition des Iods an die Doppelbindungen erfolgt. Für Reinsubstanzen kann die Iodzahl aus der Anzahl der vorhandenen Doppelbindungen

und der Molmasse des Lipides direkt berechnet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden beide Methoden verwendet, um den Sättigungsgrad anzugeben: sowohl das Verhältnis von Methyl- zu Methylengruppen als auch die Iodzahl. Es sollte untersucht werden, ob Raman-Spektroskopie an einzelnen Lipidtropfen im intakten Pilz eine schnelle, einfache und repräsentative quantitative Bestimmung des Sättigungsgrades für das SCO der gesamten Probe ermöglicht. In der vorliegenden Arbeit wurden beide Methoden verwendet, um den Sättigungsgrad anzugeben: sowohl das Verhältnis von Methyl- zu Methylengruppen als auch die Iodzahl. Es sollte untersucht werden, ob Raman-Spektroskopie an einzelnen Lipidtropfen im intakten Pilz eine schnelle, einfache und repräsentative quantitative Bestimmung des Sättigungsgrades für das SCO der gesamten Probe ermöglicht. Dabei stellte sich zunächst die Frage, ob der Sättigungsgrad für alle Lipidvesikel innerhalb einer Hyphe gleich ist oder ob es Unterschiede gibt in Abhängigkeit von Alter oder Morphologie. In einem ersten Schritt wurde daher der Sättigungsgrad von Lipidvesikeln verschiedener *Mortierella*-Spezies orts aufgelöst untersucht. In weiterführenden Experimenten wurde für verschiedene Spezies und Wachstumsbedingungen der Sättigungsgrad ihres SCO mit Raman-Spektroskopie an einzelnen Lipidtropfen quantitativ bestimmt und die Werte mit Ergebnissen aus GC-Analysen verglichen.

1.3 Eigene Forschungsergebnisse

Die Untersuchung von Mikroorganismen und ihrer Reaktion auf äußere Einflüsse ist von großem Interesse. Ein tieferes Verständnis dieser Vorgänge kann es dem Menschen ermöglichen, einige der mikrobiellen Fähigkeiten und Strategien vorteilhaft zu nutzen. Beispielhaft sei hier die Verwendung von Antibiotika durch den Menschen genannt, die durch die Forschung an Pilzen entdeckt wurde. Aber auch andere Anwendungsfelder wie die Gewinnung neuartiger Rohstoffe oder Nahrungsmittel sowie das gezielte Beeinflussen mikrobiellen Wachstums sind denkbar.

Um diese Ziele zu erreichen ist es notwendig, die Reaktionen der Mikroorganismen mit geeigneten Analysemethoden zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurde dazu die Raman-Mikrospektroskopie gewählt, da sie *In-vivo*-Untersuchungen mit hoher Ortsauflösung ermöglicht. Da die Raman-spektroskopische Identifizierung von einzelnen Bakterien eine vielversprechende neue Methode der Pathogendetektion ist, soll geprüft werden, welchen Einfluss externer Stress durch Antibiotika auf Bakterien und deren Spektren hat.

In einem weiteren Themenkomplex werden Vertreter der Gattung *Mortierella* untersucht. Diese Pilze sind dafür bekannt, dass sie große Mengen Lipide mit hohem Anteil an PUFAs produzieren können. Die Variabilität der Lipidzusammensetzung in Abhängigkeit von externen Wachstumsfaktoren hat das Interesse an diesen Pilzen erregt. In dieser Arbeit wird die Raman-Mikrospektroskopie genutzt, um den Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren auf diese Lipid-produzierende Pilze qualitativ und quantitativ zu bestimmen.

1.3.1 Untersuchung von antibiotisch behandelten Bakterien

Die schnelle Identifizierung von Bakterien ist besonders bei akut verlaufenden schweren Krankheiten wie Sepsis von besonderer Bedeutung, um rasch eine adäquate Therapie zu ermöglichen. Dabei erschwert die bei Sepsis-Patienten fast sofort beginnende (oder bereits vorangegangene) Antibiotika-Gabe die kultivierungs-basierte Identifizierung der Pathogene. Eine direkte Untersuchung von in der Probe vorhandenen Bakterien durch Raman-Mikrospektroskopie kann die kultivierungsfreie Identifizierung ermöglichen. Im Folgenden soll untersucht werden, in welchem Ausmaß Antibiotika die Bakterienspektren verändern und ob dies die spektroskopische Identifizierung beeinträchtigt.

Um mit einem praktikablen und risikoarmen Modell-System zu arbeiten, das möglichst große Ähnlichkeit zu diesem potentiellen medizinischen Anwendungsfeld hat, wurden Verwandte von typischen Sepsis-Pathogenen für diese Studie ausgewählt. Dies waren *P. stutzeri* und *P. thermotolerans* für den opportunistisch pathogenen Keim *P. aeruginosa* sowie *E. coli* DSM 423 und *E. coli* DSM 498 für pathogene *E. coli*-

Stämme. Die Wahl dieser vier Modellorganismen ermöglicht eine Unterscheidung auf verschiedenen taxonomischen Ebenen: zwischen Gattungen, Arten und Stämmen.

Ein Teil dieser Bakterien sollte mit Antibiotika behandelt werden. Um den durch Antibiotika-Einfluss entstehenden Stress möglichst gut abzubilden, wurden in der vorliegenden Arbeit vier verschiedene Antibiotika verwendet, welche die unterschiedlichen Angriffspunkte vertreten. Ampicillin als β -Lactam-Antibiotikum hemmt die Zellwandsynthese der Bakterien. Ciprofloxacin ist ein Fluorochinolon, das die DNA-Replikation behindert. Gentamicin behindert das Ablesen der mRNA an den Ribosomen und beeinflusst dadurch die Protein-Biosynthese. Sulfamethoxazol konkurriert mit para-Aminobenzoessäure um ein Enzym, wodurch die Folsäuresynthese der Bakterien erschwert wird.

Um die Bakterien durch Zugabe der Antibiotika lediglich zu stressen, jedoch nicht völlig abzutöten, wurden zunächst für alle Bakterien die minimale Hemmkonzentration (MIC, englisch *minimum inhibitory concentration*) jedes Antibiotikums nach der Verdünnungsmethode bestimmt.[141] Für die spektroskopischen Messungen wurden einem Teil der Kulturen je eines der vier Antibiotika zugesetzt. Dabei wurde die MIC des jeweils empfindlichsten Organismus als Referenzwert genutzt und alle Bakterien mit der Hälfte dieser MIC behandelt.

Zur adäquaten Auswertung der erhaltenen Einzelzell-Spektren ist der Einsatz chemometrischer Methoden nötig (siehe Kapitel 1.1). Die Spektren wurden dafür zuerst einer Hauptkomponentenanalyse unterzogen (PCA, englisch *principal component analysis*). Die PCA dient dazu, den hochdimensionalen Datensatz zu vereinfachen und zu strukturieren. Dabei werden durch Linearkombination der ursprünglichen Variablen neue Vektoren erzeugt, sogenannte Hauptkomponenten (PCs, englisch *principal components*), wobei eine geringere Anzahl an PCs und damit eine geringere Anzahl an Dimensionen die Varianz des Datensatzes besser beschreiben als die ursprünglichen Vektoren. Die so in ihrer Dimensionalität reduzierten Spektren wurden einer linearen Diskriminanzanalyse (LDA) unterzogen.

Zuerst wurde geprüft, ob es einen deutlichen Unterschied zwischen unbehandelten (nativen) und antibiotisch behandelten Bakterien gibt. Dazu wurden die Spektren aller Bakterien einer unabhängigen Messung auf zwei verschiedene Arten kombiniert. Einmal wurden jeweils alle Bakterien einer taxonomischen Gruppe zusammengefasst, unabhängig davon, ob sie antibiotisch behandelt worden waren oder nicht. Dabei ergaben sich vier Gruppen: *E. coli* DSM 423, *E. coli* DSM 498, *P. stutzeri* und *P. thermotolerans*. Im anderen Fall wurden die Spektren aller Bakterien zusammengefasst, welche die gleiche Behandlung erfahren hatten. Die fünf so entstandenen Gruppen waren native Bakterien, Ampicillin-, Ciprofloxacin-, Gentamicin- sowie Sulfamethoxazol-behandelte Bakterien. Mittels LDA sollte dann jeweils zwischen diesen Gruppen unterschieden werden.

In Abbildung 1.4 sind die entsprechenden LDA-Scoreplots und die tabellarische Zuordnung für die taxonomische (A) und antibiotische (B) Art der Spektrenzusammenfassung gezeigt.

In Teilbild A ist erkennbar, dass relativ gut zwischen den vier taxonomischen Gruppen unterschieden werden kann, selbst zwischen den beiden *E. coli*-Stämmen. Die Klassenzugehörigkeit wird für 89% der Spektren korrekt vorhergesagt. Dagegen ist im Teilbild B keine sinnvolle Unterscheidung basierend auf der Antibiotika-Behandlung zu erkennen. Nur für 58% der Spektren kann korrekt vorhergesagt werden, mit welchem Antibiotikum die Bakterien behandelt worden waren. Dies zeigt, dass die spektralen Unterschiede zwischen taxonomischen Klassen ausgeprägter sind als durch Antibiotika hervorgerufene Variationen. Dementsprechend wurde im weiteren Verlauf geprüft, unter welchen Voraussetzungen antibiotisch behandelte Bakterien spektroskopisch identifiziert werden können.

Es wurden mehrere LDA-Modelle zur taxonomischen Unterscheidung erstellt und geprüft. Dabei wurde stets in einem ersten Schritt das Modell trainiert, wofür Spektren von drei unabhängigen Messungen verwendet wurden. Die Daten einer weiteren unabhängigen Wiederholung dienten in einem späteren Schritt dazu, die Leistungsfähigkeit und Zuverlässigkeit des jeweiligen Modells zu prüfen und zu beurteilen.

Im ersten Modell wurden lediglich die Spektren unbehandelter Bakterien zur Klassifizierung verwendet. Dieses Modell wurde als Modell N bezeichnet. Dabei wurden 567 von 611 Spektren (92.8%) der richtigen Gruppe zugeordnet. Die exakte Zuordnung wurde in diesem Fall erschwert, da zwei der zu unterscheidenden Gruppen, nämlich *E. coli* DSM 423 und *E. coli* DSM 498 Stämme der gleichen Spezies und damit einander sehr ähnlich sind. Versucht man lediglich die Bakterienspezies zu ermitteln, ist dies für 596 von 611 Spektren (97.5%) erfolgreich. Für unbehandelte Bakterien eines bei der Klassifizierung nicht verwendeten Replikats konnten 415 von 520 Spektren korrekt identifiziert werden, was hauptsächlich an Fehlzuordnungen der beiden *E. coli*-Stämme zum jeweils anderen liegt. Die Spezies wird für die unbekanntten Proben für 95.8% der Spektren korrekt vorhergesagt. Damit wurde verifiziert, dass das Modell prinzipiell zur Identifizierung der verschiedenen Bakterienspezies in der Lage ist. Eine Unterscheidung zwischen den Stämmen einer Spezies ist mit diesem Modell nur eingeschränkt möglich.

In einem nächsten Schritt wurde versucht, durch Antibiotika-Behandlung gestresste Bakterien mit Modell N zu identifizieren. Dabei wurden wiederum nur Daten eines biologisch unabhängigen Replikates verwendet. Auch für diese gestressten Bakterien konnte Modell N die richtige Spezies vorhersagen (siehe Tabelle 1 und elektronisches Zusatzmaterial in [UM01]). Dies ist bemerkenswert, da bekannt ist, dass Antibiotika das Raman-Spektrum von Bakterien beeinflussen, diese Variationen jedoch nicht in der Datenbank erfasst waren.

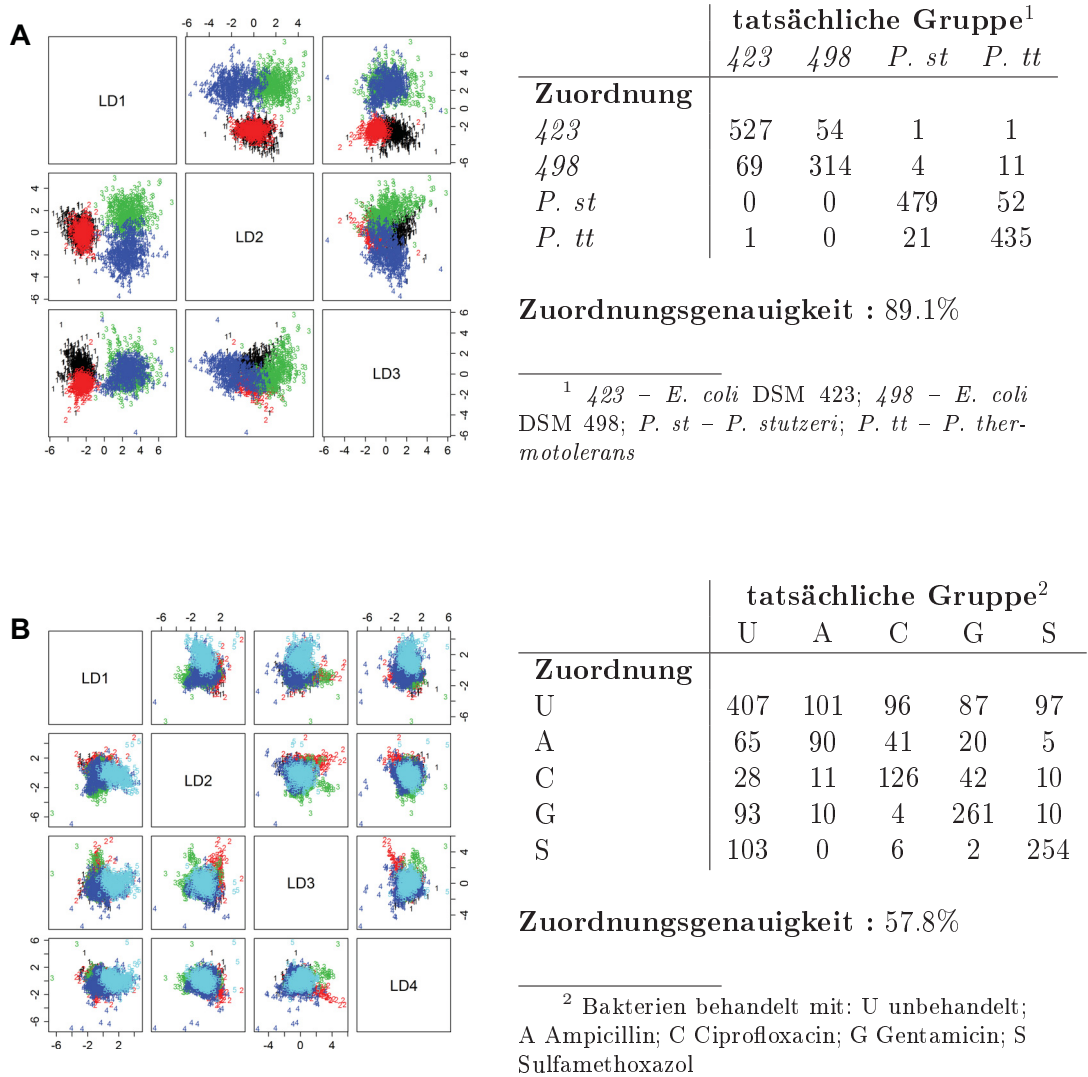


Abbildung 1.4: Ergebnisse der LDA-Klassifikation nach Taxonomie (A) oder Antibiotikabehandlung (B). In Panel A wurden behandelte und unbehandelte Daten einer taxonomischen Gruppe jeweils zusammengefasst. In Panel B wurden stattdessen Spektren mit gleicher antibiotischer Behandlung, aber von verschiedenen Spezies zu Klassen kombiniert. Die jeweilige Tabelle gibt die LDA-Zuordnung der einzelnen Spektren wieder. Klassen in Abbildung A: *E. coli* DSM 423 (1, schwarz), *E. coli* DSM 498 (2, rot), *P. stutzeri* (3, grün), *P. thermotolerans* (4, blau). Klassen in Abbildung B: unbehandelte (1, schwarz) und mit Ampicillin (2, rot), Ciprofloxacin (3, grün), Gentamicin (4, blau) oder Sulfamethoxazol (5, cyan) behandelte Proben.

Die Genauigkeit, mit der die Spezies der antibiotisch behandelten Bakterien erkannt wird, variiert dabei deutlich. Für Bakterien, die mit Ciprofloxacin oder Sulfamethoxazol behandelt wurden, ist die Erkennungsrate ähnlich hoch wie für unbehandelte Bakterien. Dagegen werden Bakterien nach Ampicillin- oder Gentamicin-Behandlung deutlich schlechter erkannt.[UM01] Dies hängt möglicherweise mit dem Wirkmechanismus der einzelnen Antibiotika zusammen (siehe Kapitel 1.2.1). Sowohl Ciprofloxacin als auch Sulfamethoxazol stoppen die Zelle nur in einem natürlich vorkommenden Zustand ihres Wachstumszyklus und verändern daher ihre Biochemie und ihr Spektrum kaum. Demgegenüber greifen Ampicillin und Gentamicin in die Biochemie der Zelle ein. Ersteres verändert Aufbau und Struktur der Zellwand, letzteres führt zur Synthese unnatürlicher Proteine. Diese antibiotisch hervorgerufenen Variationen spiegeln sich möglicherweise so deutlich im Raman-Spektrum der Zelle wieder, das Spektren dieser Bakterien nicht so erfolgreich zugeordnet werden können

Abhilfe schaffen kann hier, diese Variationen in der Klassifikations-Datenbank abzubilden und Spektren von entsprechend behandelten Bakterien aufzunehmen. Dazu wurden zwei weitere Modelle erstellt, bei denen jeweils nur Spektren antibiotisch behandelter Bakterien in die Klassifikationsdatenbank aufgenommen wurden. Modell C enthielt nur Spektren von Ciprofloxacin-behandelten Bakterien und Modell A nur Spektren von Ampicillin-behandelten Bakterien. Tatsächlich verbesserte sich die Erkennungsrate für unabhängige Spektren Ampicillin-behandelten Bakterien, wenn sie mit Modell A identifiziert wurden([UM01], Tabellen S6A-F und Abbildung S5). Ciprofloxacin-behandelte Bakterien dagegen wurden von Modell N und Modell C jeweils ähnlich gut erkannt ([UM01], Tabellen S7A-F und Abbildung S6). Dies deutet darauf hin, dass Ampicillin tatsächlich biochemische Unterschiede hervorruft, die in einem erfolgreichen Identifizierungs-Modell entsprechend berücksichtigt werden müssen.

Bemerkenswert ist, dass sich die Aufnahme antibiotisch behandelter Bakterien in die Klassifikations-Datenbank positiv auf die Stamm-Erkennung auswirkt. Behandelte Bakterien werden häufiger dem korrekten *E. coli*-Stamm zugeordnet, wenn die Wirkung des entsprechenden Antibiotikums im Trainingsdatensatz berücksichtigt wurde.[UM01] Generell erhöht das Einbinden von Spektren Antibiotika-behandelter Bakterien beim Erstellen eines Modells dessen Identifikationsgenauigkeit. Ein Modell, das mit Spektren unbehandelter und Ciprofloxacin-behandelter Bakterien erstellt wurde, zeigte erhöhte Spezies- und Stamm-Erkennungs-Fähigkeiten auch bei Bakterien, die mit anderen Antibiotika behandelt worden waren (siehe elektronisches Zusatzmaterial [UM01]). Dies deutet darauf hin, dass insgesamt die Abbildung von antibiotisch verursachtem Stress in der Spektrendatenbank von Vorteil ist.

Um zu überprüfen, welchen Einfluss die Konzentration des Antibiotikums auf die Spektren und ihre Identifizierbarkeit hat, wurden einige Bakterien mit erhöhter An-

tibiotikakonzentration behandelt. Auch diese Bakterien konnten zum überwiegenden Teil vom Modell N anhand ihrer Raman-Spektren korrekt identifiziert werden (siehe elektronisches Zusatzmaterial [UM01]).

Zur Abschätzung der Generalisierungsfähigkeit des Modells wurde ein weiterer, dem Modell unbekannter *E. coli*-Stamm untersucht. Dieser Stamm wies darüber hinaus eine Resistenz gegenüber Ampicillin auf. Trotzdem wurden nahezu alle Spektren dieses Stammes korrekt als *E. coli* identifiziert, selbst als die Ampicillin-Konzentration auf das zwanzigfache der MIC erhöht wurde (siehe elektronisches Zusatzmaterial [UM01]).

Schließlich wurde die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf pathogene Bakterien geprüft, indem pathogene *P. aeruginosa* antibiotisch behandelt und spektroskopisch untersucht wurden. Die Projektion dieser spektralen Daten in den LD-Raum des Modells N zeigte, dass sich die Daten von unbehandelten und antibiotisch behandelten *P. aeruginosa* im gleichen Raumbereich befinden (siehe elektronisches Zusatzmaterial [UM01]). Damit weisen sie das selbe Verhalten wie die in dieser Studie verwendeten apathogenen Bakterien auf. Dies ist von besonderer Bedeutung, da es zeigt, dass Pathogene spektroskopisch gesehen ähnlich auf Antibiotika-Exposition reagieren wie apathogene Bakterien und daher die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse entsprechend übertragbar sind.

Da lediglich die Gattung *Pseudomonas*, aber nicht genau diese Spezies in der Datenbank repräsentiert war, konnte keine Bestimmung der Bakterienspezies erfolgen, sondern nur eine Gattungsbestimmung. Diese wurde für 97% der unbehandelten und 91-98% der antibiotisch behandelten *P. aeruginosa* korrekt bestimmt.[UM01]Eine Ausweitung der Datenbank auf die entsprechende Bakterienspezies, auf die in dieser Untersuchung zugunsten der Betrachtung einer möglichst großen Zahl von Antibiotika verzichtet worden war, würde aber aller Voraussicht nach auch hier eine Speziesbestimmung ermöglichen.

Somit konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Behandlung von Bakterien mit Antibiotika zwar deren Raman-Spektrum beeinflusst, dieser Einfluss jedoch im Vergleich zur Variation zwischen Spezies vergleichsweise gering bleibt. Dementsprechend ist eine Identifizierung von einzelnen Bakterien trotz Antibiotika-Einfluss mittels Raman-Mikrospektroskopie möglich. Die Berücksichtigung von antibiotischem Stress bei der Erstellung von Identifikations-Modellen ist dennoch ratsam, da sie das Resultat verbessert indem die Genauigkeit erhöht wird. Auch wurde gezeigt, dass Variationen der Konzentrationen keinen Störfaktor darstellen, um bekannte oder unbekannte Bakterienproben zu identifizieren. Anhand eines pathogenen Bakterienstammes konnte weiterhin gezeigt werden, dass die spektroskopische Reaktion von apathogenen und pathogenen Bakterien auf Antibiotika-Einwirkung gleich ist, was eine Übertragung dieser Erkenntnisse auf Pathogene erlaubt.

Aufgrund dieser Erkenntnisse lässt sich schlussfolgern, dass die Methode der Raman-

spektroskopischen Identifizierung von Bakterien nicht durch die Anwesenheit von Antibiotika beeinflusst wird. Die Möglichkeit, einzelne Bakterienzellen zu untersuchen bietet zusätzlich den großen Vorteil, dass keine Vermehrung der Probeorganismen nötig ist. Eine solche neue Analyseverfahren ist in der medizinischen Diagnostik von großem Vorteil, da sie die schnelle und direkte Identifizierung von Pathogenen erlaubt, was wiederum eine rasche und adäquate Behandlung nach sich ziehen kann. Aber auch außerhalb des medizinischen Bereiches ist eine solche Technik, die robust gegen Stressoren wie Antibiotika ist, von großem Wert. Sie ermöglicht eine zuverlässige Untersuchung auch solcher Bakterien, die bisher nicht oder nur schwer kultivierbar sind.

Im Falle der Antibiotika ist der Einfluss des Stresses auf die Bakterienspektren so gering, dass sie auch bei multivariater chemometrischer Analyse nur vernachlässigbare Auswirkungen zeigen. Andere Umwelteinflüsse können dagegen weit deutlichere Variationen in den Raman-Spektren hervorrufen, zum Beispiel wenn bei guten Wachstumsbedingungen Speicherstoffe gebildet werden. Dieser Effekt wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls untersucht und soll im folgenden Abschnitt näher diskutiert werden.

1.3.2 Qualitative Untersuchung von Pilzlipiden mit Raman-Spektroskopie

Pilze der Gattung *Mortierella* sind dafür bekannt, dass sie bei Nahrungsüberangebot Lipide in großen Mengen produzieren und in ihren Hyphen speichern können. Dabei ist der Anteil an PUFAs mit besonders langen Kohlenstoffketten und sehr vielen Doppelbindungen in diesen Pilz-produzierten Lipiden oft besonders groß. Die Untersuchung der *Mortierella*-Pilze ist deshalb schon seit längerer Zeit ein Fokus der Wissenschaft. Die gängige Analytik erfolgt durch Extraktion der Biomasse mit anschließender Gaschromatographischer Auftrennung der einzelnen Komponenten (siehe Kapitel 1.2.2). Aufgrund der dafür nötigen Extraktionsschritte gab es bisher jedoch noch keine Untersuchungen an intakten oder lebenden Hyphen.

Die Raman-Mikrospektroskopie bietet eine Möglichkeit, lebende Hyphen zu untersuchen. Lipide sind generell mittels Raman-Spektroskopie sehr gut untersuchbar, da sie intensive Raman-Signale geben. Anhand dieser Signale können verschiedene Lipid-Parameter und besonders der Sättigungsgrad bestimmt werden (siehe Kapitel 1.2.2). Durch die hohe Ortsauflösung der Raman-Mikrospektroskopie können gezielt einzelne Lipidtropfen innerhalb einer Hyphe untersucht werden. In einem ersten Schritt wurde daher qualitativ untersucht, ob und wie sich der Sättigungsgrad in verschiedenen Lipidvesikeln einer Hyphe verändert.

Die lipidhaltigen Pilzhyphen zeigen im Lichtmikroskopbild Vesikel unterschiedlicher Größe. In Abbildung 1.1B ist eine Hyphe mit verschiedenen großen Öltropfen zu

sehen. Exemplarisch ist auch die Größe des Laserpunktes im Verhältnis zur Pilzhyphe dargestellt. Da nur spektrale Information aus dem Bereich des Laserfokus erhalten wird, ist die selektive Untersuchung einzelner Tropfen möglich. Die dabei erhaltenen Spektren sind typische Lipidspektren und bestätigen, dass die Vesikel zum überwiegenden Teil aus Lipiden bestehen (siehe Abbildung 2 in [UM02]).

Zur Bestimmung des Sättigungsgrades sollte ein Verhältnis zweier Banden bestimmt werden, welche die spezifischen Lipidstrukturen $-\text{CH}_2$ und $=\text{CH}$ widerspiegeln. Charakteristisch für $=\text{CH}$ -Gruppen sind die Signale der $\text{C}=\text{C}$ -Doppelbindung um 1660 cm^{-1} und der $=\text{C}-\text{H}$ -Deformationsschwingung um 1260 cm^{-1} . Typische Signale von Methylengruppen sind Deformationsschwingungen und liegen bei 1300 und 1440 cm^{-1} . Für jede Gruppe kann eine der charakteristischen Banden zur Analyse herangezogen werden, sodass in der Literatur verschiedene Varianten beschrieben sind, ein solches Intensitätsverhältnis zu berechnen.[127, 131, 132, 142] Für die orts aufgelöste Analyse einzelner Lipidvesikel wurden in Anlehnung zu vorangegangenen Analysen zur Auswertung das Signal der $=\text{CH}$ -Deformationsschwingung bei 1260 cm^{-1} und das Signal der $-\text{CH}_2$ -Deformationsschwingung bei 1300 cm^{-1} ausgewählt.[138, 142] An diese beiden Banden wurde jeweils ein Lorentz-Profil angepasst, aus welchem die Werte für weitere Auswertungen übernommen wurden. Aus den Intensitäten der Lorentz-Fits wurde ein Verhältnis $I(-\text{CH}_2)/I(=\text{CH})$ berechnet. Dieser Wert wurde für die weiteren Analysen verwendet.

In einem ersten Schritt wurde die Messgenauigkeit der Methode bestimmt. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Raman-Messungen von Lipiden mit großer Genauigkeit und Reproduzierbarkeit durchgeführt werden können.[17, 127, 142–144] Allerdings wurden bisherige Messungen an reinen Lipid-Proben durchgeführt, die gegebenenfalls aus dem Organismus extrahiert worden waren. Daher bestanden bei diesen Messungen keine Probleme mit Fremdstoffen in der Probe. Bei der Messung der Lipid-Vesikel in einer intakten Hyphe ist dagegen zu berücksichtigen, dass auch andere Komponenten im Laserfokus vorhanden sind. Dies sind in jedem Falle die Zellwand der Hyphe, gegebenenfalls aber auch Cytoplasma oder andere kleinere Organellen wie Ribosomen. All diese Substanzen tragen ebenfalls mehr oder weniger stark zum Spektrum bei und haben dadurch Einfluss auf die Messgenauigkeit der Methode. Um nun die Genauigkeit zu bestimmen wurde für mehrere Spezies jeweils ein Lipidvesikel sowohl an verschiedenen lateralen als auch verschiedenen axialen Positionen gemessen (siehe Abbildung 3 in [UM02]). Unter der Annahme, dass ein einzelner Vesikel an allen Stellen die gleiche Zusammensetzung hat und daher das Intensitätsverhältnis für alle Messungen eines Tropfens gleich sein sollte, wurde die Messgenauigkeit der Methode zu 0.022 Einheiten bestimmt.[UM02]

Um nun die Homogenität der Lipidvesikel innerhalb einer Hyphe bestimmen zu können, muss diese über eine möglichst lange Strecke hinweg nachverfolgt werden

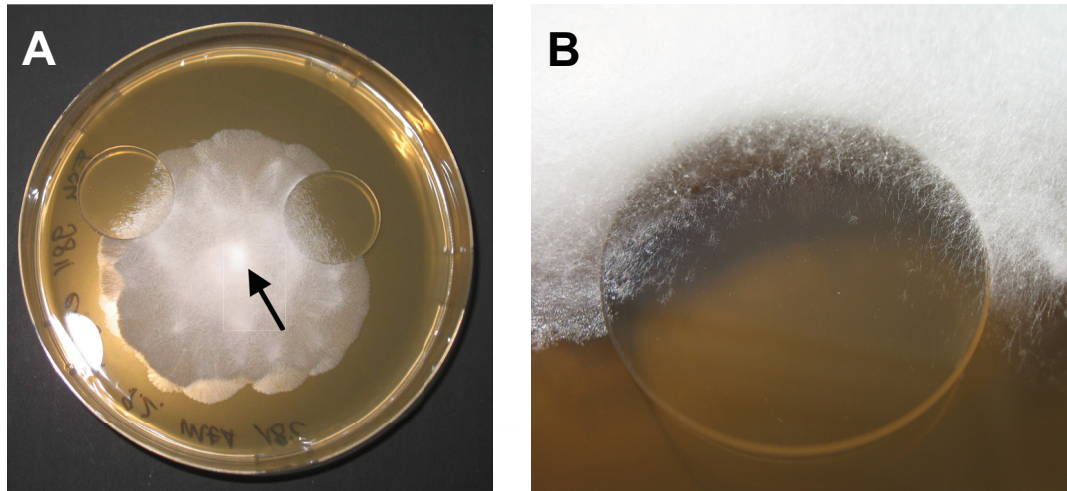


Abbildung 1.5: Probenkultivierung für ortsaufgelöste Untersuchungen. In Bild A ist eine Petrischale mit zwei auf dem Medium platzierten Quarz-Objektträgern zu sehen. Der Impfblock, von dem aus der Pilz auf das Substrat und die Objektträger wächst, ist als heller Punkt in der Mitte des Luftmyzels zu erkennen und mit einem Pfeil markiert. Bild B zeigt die Nahaufnahme eines Quarz-Objektträgers. Deutlich sind die einzelnen Hyphen zu erkennen, die flach auf den Objektträger aufwachsen.

können. Dazu wurden während der Kultivierung der Pilze in einem Abstand vom Impfblock Raman-geeignete Quarz-Objektträger auf den Nährboden gelegt wie in Abbildung 1.5A gezeigt. Während des Myzelwachstums breitet sich der Pilz auch auf dem Objektträger aus, wodurch die Hyphen weitgehend einzeln und flach auf dem Untergrund liegen (siehe Abbildung 1.5B). Je nach Wachstumsgeschwindigkeit des Pilzes und Entfernung des Objektträgers vom Impfblock dauert es zwischen 5 und 10 Tage, bis der Objektträger etwa zu $\frac{2}{3}$ von Hyphen bewachsen ist. Für die spektroskopischen Untersuchungen kann der Objektträger dann vom Untergrund abgehoben und direkt unter das Mikroskop gelegt werden, ohne dass weitere Präparationsschritte nötig sind.

In diesen so vereinzelt Hyphen wurden nun jeweils von der Hyphenspitze ausgehend zahlreiche Lipidvesikel über Strecken bis zu $4900 \mu\text{m}$ Raman-spektroskopisch untersucht. Das Intensitätsverhältnis $I(-CH_2)/I(=CH)$ der einzelnen Lipidspektren wurde anschließend aufgetragen gegen den Abstand von der Hyphenspitze. Dabei zeigte sich, dass direkt hinter der Hyphenspitze für ein paar hundert Mikrometer eine andere Lipidzusammensetzung in den Vesikeln zu finden ist als in den weiter entfernten Hyphenteilen. Dieser Effekt wurde in Hyphen verschiedener Spezies beobachtet und erstreckte sich stets etwa über die ersten $600 \mu\text{m}$ hinter der Spitze (Abbildung 4 in [UM02]). Während in den weiter entfernten Hyphenteilen ein einheitlicher Wert für das Intensitätsverhältnis und damit für den Sättigungsgrad beobachtet wurde, erwies

sich die Zusammensetzung im vorderen Hyphenteil als sehr variabel. In den meisten der untersuchten Hyphen sinkt das Intensitätsverhältnis je näher der Öltropfen an der Hyphenspitze ist, was einer steigenden Anzahl von Doppelbindungen im Lipid entspricht. Es wurden aber auch einige Hyphen vermessen, bei denen das Verhältnis gleich blieb oder sogar anstieg, was einer geringeren Zahl von Doppelbindungen im Lipid entspricht.

Da aus der Literatur bekannt ist, dass das Längenwachstum von Pilzen hauptsächlich an den Hyphenspitzen und den Verzweigungspunkten stattfindet,[145] wurden an mehreren Hyphen auch Verzweigungen untersucht. Ein Beispiel eines besonders stark verzweigten Hyphenabschnittes ist in Abbildung 5A von [UM02] gezeigt. Die dazugehörigen Intensitätsverhältnisse sind in Abbildung 5B zu sehen. Es ist zu erkennen, dass sowohl an den Verzweigungspunkten als auch in den abzweigenden Hyphen das gleiche Intensitätsverhältnis zu finden ist wie in der ursprünglichen Hyphe. Allerdings ist auch hier zu sehen, dass für lange Äste das Phänomen der absinkenden Intensitätsverhältnisse zur Hyphenspitze hin zu beobachten ist. Dass dieser Effekt nicht deutlicher sichtbar ist, liegt vermutlich daran, dass die abzweigenden Äste noch nicht lang genug sind.

Interessanterweise konnte an einer Probe auch eine Anastomose beobachtet und spektroskopisch untersucht werden. Dabei handelt es sich um das Zusammenwachsen/Verschmelzen zweier voneinander unabhängiger Hyphen. Abbildung 6 in [UM02] zeigt das lichtmikroskopische Bild der Anastomose und die dazugehörigen Bandenintensitätsverhältnisse. Dabei ist oben im Bild die hauptsächlich untersuchte Hyphe zu sehen, unten die zweite Hyphe. Die beiden Hyphen sind durch einen abzweigenden Ast miteinander verbunden. Sowohl in dem Seitenast der untersuchten Hyphe als auch in der unteren, zweiten Hyphe, die mit diesem Seitenast verschmolzen ist, werden für die untersuchten Lipidvesikel die gleichen Bandenintensitätsverhältnisse bestimmt wie für die Haupthyphe. Dies ist besonders interessant, da es darauf hindeutet, dass es auch zwischen verschiedenen Hyphen in einer Probe keine Unterschiede im Sättigungsgrad des Lipides gibt.

Diese Vermutung wurde weiterführend untersucht, indem an einer Probe mehrere Einzelhyphen über längere Strecken vermessen wurden. Wie in Abbildung 7 in [UM02] zu sehen ist, variiert die Lipidzusammensetzung in den ersten 600 μm hinter der Spitze deutlich, nähert sich mit zunehmendem Abstand von der Spitze jedoch einem allen Hyphen gemeinsamen Wert an. Dieser Effekt konnte für verschiedene Spezies verifiziert werden. Verschiedene Hyphen einer Probe enthalten also in älteren Teilen des Myzels alle ein Lipid homogener Zusammensetzung.

Neben dem positiven Faktor Nahrungsüberangebot waren die einzelnen Pilzkulturen gleichzeitig immer auch anderen Umwelteinflüssen ausgesetzt. Die Proben wurden auf verschiedenen Nährmedien, bei variierenden Temperaturen und unterschiedlich

lange kultiviert. Häufig beobachtete Reaktion der *Mortierella* auf derartigen Umweltstress ist eine in Menge und Zusammensetzung veränderte Lipidproduktion.[102, 104, 105] Auch bei den Raman-spektroskopischen Untersuchungen wurden je nach Wachstumsbedingungen Variationen im Sättigungsgrad beobachtet. Dies zeigt, dass auch die Auswirkungen derartiger Umwelteinflüsse mit Raman-Mikrospektroskopie an einzelnen, intakten Lipidvesikeln untersucht werden können.

Die bisher vorgestellten Ergebnisse basieren ausschließlich auf dem qualitativen Vergleichen der Bandenintensitäts-Verhältnisse verschiedener Proben untereinander. Damit ist jedoch noch keine quantitative Aussage über den Sättigungsgrad der entsprechenden Lipide möglich. Um das zu erreichen, müssen die spektroskopisch bestimmbareren Werte mit anderen Kenngrößen verknüpft werden. Diese Untersuchungen sollen im folgenden Kapitel diskutiert werden.

1.3.3 Quantifizierung des Sättigungsgrades von Pilzlipiden mit Raman-Spektroskopie

Im vorherigen Kapitel wurde bereits diskutiert, dass eine Reihe von Umweltfaktoren einen messbaren Einfluss auf die Zusammensetzung der von *Mortierella* gebildeten Pilzöle haben. Um diese Unterschiede in der Lipidzusammensetzung nicht nur qualitativ durch Änderungen des Intensitätsverhältnisses zu beschreiben, sondern in Zahlen ausdrücken und quantifizieren zu können, wurden die spektroskopischen Daten im weiteren Verlauf der Arbeit mit anderen Werten verknüpft.

In einem ersten Schritt wurden dafür eine Vielzahl von Lipid-Referenzsubstanzen untersucht. Diese waren sowohl freie Fettsäuren als auch Triglyceride, jeweils mit unterschiedlichen Kettenlängen und unterschiedlicher Anzahl von Doppelbindungen in den Fettsäuren, sodass eine möglichst große Spanne von Sättigungsgraden repräsentiert ist. Eine vollständige Liste der verwendeten Substanzen ist in [UM03] Tabelle 1 gegeben. Von allen diesen Substanzen wurden Raman-Spektren aufgenommen und das Bandenintensitätsverhältnis $I(1300\text{ cm}^{-1})/I(1260\text{ cm}^{-1})$ bestimmt. Dabei zeigte sich, dass dieses Verhältnis ungeeignet ist, um Lipide mit besonders hohem oder besonders geringem Sättigungsgrad zuverlässig zu charakterisieren. Im ersten Fall führt das bei vollständig gesättigten Lipiden fehlende =CH-Signal zur Division durch null. Im zweiten Fall überlagert die intensive =CH-Bande bei 1260 cm^{-1} das -CH₂-Signal bei 1300 cm^{-1} derart, dass letzteres nicht reproduzierbar beschrieben werden konnte. Aus diesen Gründen wurden für die Quantifizierung des Sättigungsgrades zwei andere Banden, nämlich die Signale bei 1260 und 1440 cm^{-1} verwendet und das Intensitätsverhältnis nach $I(=CH)/I(-CH_2, -CH_3)$ berechnet. Dieses Verhältnis wurde dann jeweils gegen das Strukturverhältnis $n(=CH)/[n(-CH_2) + n(-CH_3)]$, das aus der chemischen Struktur der Referenzverbindung durch Auszählen der Methyl- und Methylengruppen bestimmt werden kann, aufgetragen. Daraus ergibt sich eine Kali-

brationsgerade (siehe [UM03], Elektronisches Zusatzmaterial), mit deren Hilfe auch für unbekannte Proben das Strukturverhältnis aus dem Bandenverhältnis bestimmt werden kann.

Um beliebige Pilzproben analysieren zu können, ist die bisher genutzte Probenpräparationsmethode, das Myzel auf einen Objektträger aufwachsen zu lassen, jedoch ungeeignet. Durch Anzahl der Objektträger und deren Abstand zur Animpfstelle wären sowohl die mögliche Probenanzahl als auch Zeitpunkte der Probennahme stark festgelegt und könnten nicht mehr an sich ändernde Anforderungen angepasst werden. Weiterhin ist diese Methode nur dann gut praktikabel, wenn das Substrat nur an einer Stelle mit Myzel beimpft wird und wenn das Substrat eben ist. Schon die Verwendung von Pilzsporen zur Inokulation, die gleichmäßige Durchmischung des Mediums mit Myzel oder die Kultivierung auf einem heterogenen Substrat verhindert das Bewachsen eines Objektträgers in einer spektroskopisch analysierbaren Form. Eine andere Methode der Probengewinnung ist also nötig. Vorteilhaft wäre statt der Untersuchung einzelner Hyphen über mehrere hundert Mikrometer die Entnahme von Luftmyzel an beliebiger Position der Probe und Messung von zufällig ausgewählten Lipidvesikeln.

Gemäß diesen Überlegungen wurde eine alternative Präparationsmethode getestet. Dazu wurde etwas Luftmyzel an beliebiger Stelle einer Kultur entnommen. Dieses Myzel wurde dann unter Zuhilfenahme von wenig Wasser auf einem Objektträger ausgebreitet, um die einzelnen Hyphen im Lichtmikroskop erkennen und Raman-spektroskopisch untersuchen zu können. Zur Überprüfung, ob das Analyseergebnis einer so gewonnenen Probe repräsentativ und reproduzierbar ist, wurden für verschiedene Spezies jeweils zwei Proben parallel unter identischen Bedingungen kultiviert und anschließend untersucht. Von jeder Probe wurden zwischen 15 und 25 Spektren von zufällig ausgewählten Lipidvesikeln aufgenommen, jeweils die Banden mit einer Lorentzfunktion gefittet und aus den Intensitäten dieser Fits das Verhältnis $I(=CH)/I(-CH_2, -CH_3)$ berechnet. Für die so erhaltenen Werte wurden der Median sowie das erste und dritte Quartil berechnet.

Die Probenahme erfolgte bei beiden Proben an einer zufällig gewählten Stelle der Kulturplatte und die zu messenden Vesikel wurden beliebig in der Probe gewählt. Dennoch konnte gezeigt werden, dass bei Messung einer genügend großen Anzahl von Lipidvesikeln (15 oder mehr) aus den erhaltenen Spektren jeweils für beide Proben der gleiche Medianwert für das Intensitätsverhältnis bestimmt wird (siehe Abbildung 2 in [UM03]). Da somit gezeigt werden konnte, dass diese Art der Probengewinnung reproduzierbare Ergebnisse ermöglicht, wurde sie für die weiteren Untersuchungen zur Quantifizierung angewendet.

Zur Evaluation der Probenahmetechnik wurden eine Vielzahl von *Mortierella*-Spezies spektroskopisch analysiert. Wie zu erwarten war, zeigten die verschiedenen

Spezies dabei unterschiedliche Bandenintensitätsverhältnisse (siehe [UM03], Abbildung 2), was Variationen im Sättigungsgrad der jeweiligen Pilzlipide entspricht. Dieses Ergebnis ist nicht unerwartet, da in der Literatur beschrieben ist, dass sich die Lipidzusammensetzung zwischen den Spezies unterscheidet.[97, 98, 104, 105] Für die quantitative Bestimmung des Sättigungsgrades aus den Raman-Spektren wurde jedoch nur eine Auswahl der bereits untersuchten *Mortierella*-Spezies genauer untersucht. Kriterien für die Auswahl waren dabei ein relativ hoher Lipidgehalt der jeweiligen Spezies sowie die möglichst gleichmäßige Repräsentation aller beobachteten Sättigungsgrade. Die Wahl fiel auf die sechs Spezies *M. alpina*, *M. antarctica*, *M. elongata*, *M. exigua*, *M. hyalina* und *M. parvispora*. Diese Spezies wurden unter Lipid-akkumulierenden Bedingungen kultiviert und anschließend Proben nach dem oben beschriebenen Verfahren Raman-spektroskopisch untersucht.

Parallel dazu wurden die Lipide dieser Pilzproben auch mittels GC als Referenzmethode analysiert. Dazu wurde nach der Probenahme für die Raman-Spektroskopie das gesamte verbliebene Luftmyzel geerntet und nach der Methode von Folch extrahiert,[116] welche leicht modifiziert wurde, um auch mit den geringen Mengen Pilzmyzel durchführbar zu sein. Die Fettsäuren der so gewonnenen Pilzöle wurden durch Behandlung mit Natriummethylat in die freien Fettsäuremethylester überführt, welche anschließend gaschromatographisch identifiziert und quantifiziert wurden. Aus den GC-Daten kann berechnet werden, wie viele Anteile von =CH-Gruppen und -CH₂/-CH₃-Gruppen die einzelnen enthaltenen Fettsäuren zur Gesamtzusammensetzung der Probe beitragen und es lässt sich daraus ein Verhältnis $n(=CH)/[n(-CH_2) + n(-CH_3)]$ berechnen, welches analog zu dem Strukturverhältnis der Lipid-Referenzsubstanzen ist.

Für jede Probe kann nun ein Wertepaar bestimmt werden aus dem Strukturverhältnis, welches aus der GC berechnet wurde (SV_{GC}) und dem, welches spektroskopisch bestimmt wurde (SV_{Raman}). Letzteres kann mit dem bestimmten Bandenintensitätsverhältnis unter Verwendung der Referenzsubstanz-Kalibrationsgerade ausgerechnet werden. Trägt man die Wertepaare für alle Proben, die unter gleichen Bedingungen kultiviert wurden, nun gegeneinander auf, so liegen die Punkte alle sehr dicht um eine Ursprungsgerade mit dem Anstieg 1 verteilt (siehe beispielsweise Abbildung 4 in [UM03]). Dies bedeutet, dass die Bestimmung des Strukturverhältnisses mit beiden Methoden zum gleichen Wert führt, SV_{Raman} und SV_{GC} also äquivalent sind. Damit ist gezeigt, dass die Raman-Spektroskopie in der Lage ist, das Strukturverhältnis $n(=CH)/[n(-CH_2) + n(-CH_3)]$ einer beliebigen Lipidprobe auf eine sehr schnelle und einfache Art zu bestimmen.

Nun ist zwar dieses SV_{Raman} bereits ein Maß für den Sättigungsgrad des Lipides, jedoch ist es keine allzu gebräuchliche Angabe. Weiter verbreitet und akzeptiert in der Lipid-Analytik ist die Iodzahl. Sie gibt an, wie viel Gramm Iod von 100 g einer Probe-

substanz durch Reaktion verbraucht werden können. Im Falle ungesättigter Lipide ist die Reaktion die Addition des Iods an die Kohlenstoffdoppelbindung. Pro Doppelbindung wird dabei ein Molekül Iod verbraucht. Aus der chemischen Strukturformel kann für jede Lipid-Referenzsubstanz die entsprechende Iodzahl berechnet werden. Die Abhängigkeit der Iodzahl vom Strukturverhältnis $n(=CH)/[n(-CH_2) + n(CH_3)]$ kann mit einem Polynom zweiten Grades beschrieben werden. Unter Verwendung dieser Polynomgleichung kann nun jeder beliebige Strukturverhältnis-Wert in eine Iodzahl umgerechnet werden. Entsprechend wurde für die spektroskopisch bestimmten Werte jeder Pilzprobe die jeweilige Iodzahl berechnet.

Um die Werte wiederum mit den GC-Ergebnissen vergleichen zu können, wurde aus den GC-Daten direkt die Iodzahl der jeweiligen Probe berechnet. Einzelheiten zu den Rechnungen finden sich in den elektronischen Zusatzinformationen zu [UM03]. Ein Vergleich der spektroskopisch und gaschromatographisch bestimmten Iodzahlen ist in Tabelle 4 in [UM03] zu finden und zeigt, dass sich die mit Raman-Spektroskopie und mit GC bestimmten Iodzahlen nur wenig voneinander unterscheiden. Dies ist bemerkenswert, da die spektroskopischen Ergebnisse an mikroskopisch kleinen einzelnen Vesikeln im lebenden Pilz erhalten wurden, während die GC-Ergebnisse aus einer makroskopischen Menge extrahierten Lipids bestimmt wurden.

Die sechs ausgewählten Spezies wurden zusätzlich auch unter verschiedenen Bedingungen kultiviert, um den Einfluss verschiedener Kultivierungsparameter auf den Sättigungsgrad zu untersuchen. Aus vorheriger Forschung ist bekannt, dass abgesehen von der Kultivierungszeit auch die Wachstumstemperatur und die Zusammensetzung des Mediums großen Einfluss auf die Lipid-Zusammensetzung haben.[87, 98, 102, 104, 105, 112] Beim Medium beeinflussen besonders Art und Menge der Kohlenstoff- und Stickstoffquelle das SCO. Daher wurden die Parameter Temperatur und Medium auch in dieser Arbeit variiert. Kultiviert wurden die Proben bei 18 °C oder 25 °C. Als Medien wurden Malzextraktagar (MEA) und Glycerinagar (GYA) verwendet, welche sich in Kohlenstoff- und Stickstoffquelle unterscheiden. Die Lipide aller Proben wurden wiederum sowohl Raman-spektroskopisch als auch mittels GC analysiert.

Ein Überblick über die spektroskopisch bestimmten Medianwerte der Bandenintensitätsverhältnisse ist in Abbildung 3 in [UM03] für alle Kultivierungsbedingungen zu sehen. Auch unter verschiedenen Wachstumsbedingungen ist zu sehen, dass sich die Medianwerte für die einzelnen Spezies voneinander unterscheiden. Für *M. alpina* werden unter allen Wachstumsbedingungen die größten Werte bestimmt, für *M. exigua* die kleinsten. Dies bedeutet, dass Lipide von *M. exigua* den höchsten Sättigungsgrad haben, also die wenigsten ungesättigten Fettsäuren enthalten, während Lipide von *M. alpina* den niedrigsten Sättigungsgrad und entsprechend besonders viele ungesättigte Fettsäuren enthalten beziehungsweise Fettsäuren mit einer besonders großen Anzahl an Doppelbindungen.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Pilze bei Wachstum auf GYA ein Lipid mit geringerem Sättigungsgrad (also mehr ungesättigten Fettsäuren) produzieren als bei Wachstum auf MEA. Dies kann allerdings sowohl an der unterschiedlichen Kohlenstoffquelle (Glycerin im GYA statt Glucose im MEA) als auch an der unterschiedlichen Stickstoffquelle (Hefeextrakt im GYA statt Malzextrakt und Sojabohnen-Pepton im MEA) liegen. Der Einfluss der Temperatur erwies sich in unseren Experimenten als gering. Tendenziell wurden aber bei höheren Temperaturen eher ansteigende Sättigungsgrade beobachtet, was mit den Daten der Literatur übereinstimmt, wonach die Menge ungesättigter Fettsäuren mit steigender Temperatur abnimmt.[87, 105, 106, 112, 146–148]

Für *M. alpina* sind in den verschiedenen Messungen deutliche Variationen sowohl für die Werte innerhalb einer Probe als auch für die Werte verschiedener Replikate zu beobachten. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass in den Lipidspektren dieser Spezies häufig noch weitere Signale in variierender Intensität zu beobachten waren, welche die Auswertung stören können.[UM03] Möglicherweise handelt es sich dabei um die Signale kurzkettiger Polyene, welche in Zygomyceten als Sexualhormone vorkommen.[149, 150]

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es möglich ist, beliebige einzelne Lipid-Vesikel in lebenden Hyphen von *Mortierella*-Spezies mittels Raman-Spektroskopie zu untersuchen. Aus den so erhältlichen Lipid-Spektren kann der Sättigungsgrad des Pilzlipides als Strukturverhältnis $n(=CH)/[n(-CH_2) + n(-CH_3)]$ oder als Iodzahl repräsentativ bestimmt werden. Diese Resultate sind dabei denen einer gaschromatographischen Analyse vergleichbar. Im Gegensatz zur GC ist jedoch die notwendige Probenvorbereitung für Raman-spektroskopische Untersuchungen wesentlich einfacher, da keine Extraktion oder Derivatisierung der Probe nötig ist. Auch können dank der hohen räumlichen Auflösung mit Raman-Mikrospektroskopie Vesikel in intakten biologischen Proben untersucht werden. Dadurch werden orts aufgelöste Untersuchungen möglich, um beispielsweise die Entstehung der Lipidtropfen weitergehend zu untersuchen. Aufgrund des nicht-invasiven und zerstörungsfreien Charakters der Raman-Spektroskopie kann eine Probe sogar in Intervallen wiederholt analysiert werden um so Einflüsse über einen längeren Zeitraum zu studieren.

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse erlauben so in Zukunft ein detaillierteres Studium lipidproduzierender Mikroorganismen. Auch der Einfluss verschiedener Umweltfaktoren wie Nährmedium oder Temperatur kann mit dieser Methode schnell und einfach eingeschätzt werden. Dies ist für die Untersuchung von SCO-produzierenden Mikroorganismen und der Analyse ihrer Reaktion auf verschiedene Umweltbedingungen oder Stressoren von großem Wert.

1.4 Resümee

Mikroorganismen haben durch die mannigfaltigen Interaktionen mit ihrer Umwelt eine Vielfalt von Methoden entwickelt, auf die Herausforderungen der Umwelt zu reagieren. Diese Fähigkeiten stellen einen enormen Fundus an Funktionen und Substanzen dar, welche dem Menschen von Nutzen sein können. Dazu ist es jedoch nötig, die Reaktionen von Mikroben auf verschiedene äußere Reize zu erforschen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von zwei verschiedenen Umweltfaktoren auf Bakterien oder Pilze mittels Raman-Spektroskopie zu untersuchen.

Im ersten Teil der Arbeit wurde geprüft, welchen Einfluss antibiotisch hervorgerufener Stress auf Bakterien der Gattungen *Pseudomonas* und *Escherichia* hat. Motiviert von der potenziellen Anwendung der Raman-Spektroskopie in der medizinischen Diagnostik lag der Fokus auf der Frage, in welchem Ausmaß der antibiotische Stress die Bakterienzellen und deren Raman-Spektren verändert. Es wurden vier Bakteriengruppen sowohl ohne als auch unter Antibiotikaeinfluss kultiviert und anschließend einzelne Bakterienzellen mittels Raman-Mikrospektroskopie untersucht.

Mittels einer linearen Diskriminanz-Analyse wurde zwischen den vier Gruppen auf unterschiedlichen taxonomischen Ebenen unterschieden. Zunächst wurden nur Spektren unbehandelter Bakterien verwendet, um ein Klassifikationsmodell zu erstellen. Mit diesem Modell konnten für unabhängige Proben trotz Behandlung mit unterschiedlichen Antibiotika bis zu 97% der Bakterien anhand ihrer Raman-Spektren korrekt identifiziert werden. Für die verschiedenen Antibiotika zeigten sich jedoch unterschiedlich starke Beeinträchtigungen der Identifizierbarkeit. Durch die Aufnahme antibiotisch gestresster Bakterien in die Datenbank zur Modell-Erstellung konnte die Erkennungsrate für behandelte Bakterien erhöht werden.

Weiterführende Experimente ergaben, dass die Konzentration des Antibiotikums keinen erkennbaren Einfluss auf die Identifizierbarkeit der Bakterien ausübt. Auch unbekannte Stämme wurden trotz variierender Antibiotikumskonzentration im Wachstumsmedium korrekt identifiziert. Die Analyse der pathogenen Spezies *P. aeruginosa* unter identischen Bedingungen zeigte, dass pathogene Bakterien vom spektroskopischen Standpunkt aus sehr ähnlich auf Antibiotika-Stress reagieren wie apathogene, was die Übertragung der Erkenntnisse auf medizinische Anwendungen erlaubt.

Somit wurde nachgewiesen, dass auch antibiotisch gestresste Bakterien anhand ihrer Raman-Spektren identifizierbar sind, dieser Stress zur genaueren Erkennung der Spezies aber beim Erstellen des Modells mit einfließen sollte.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde erforscht, welchen Einfluss positiver Stress durch Nahrungsüberangebot auf filamentöse Pilze der Gattung *Mortierella* hat. Dazu wurde

dieser oliginöse Pilz unter verschiedenen Bedingungen kultiviert und die dabei gebildeten Lipid-Tropfen spektroskopisch analysiert. Anhand der Raman-Spektren wurde der Sättigungsgrad der Lipide bestimmt.

Dank der hohen Ortsauflösung der Raman-Mikrospektroskopie konnten die einzelnen Vesikel direkt in den intakten Hyphen untersucht werden. Dies erlaubt eine ortsaufgelöste Analyse der Lipidtropfen im Myzel. Es zeigte sich, dass der Sättigungsgrad in weiten Teilen des Myzels gleich ist. Lediglich in einem Bereich von etwa 600 μm hinter der Hyphenspitze wurde eine hohe Variabilität des Sättigungsgrades beobachtet. Andere morphologische Strukturen wie Verzweigungspunkte oder Anastomosen hatten dagegen keinen Einfluss.

Der Sättigungsgrad wurde für sechs *Mortierella*-Spezies quantitativ mittels Raman-Spektroskopie bestimmt und die Ergebnisse anhand von Gaschromatographie-Messungen validiert. Dabei wurden mit beiden Methoden auch für unterschiedliche Wachstumsbedingungen jeweils gleiche Werte erhalten. Es wurde gezeigt, dass die Spezies auf Glycerin-Medium Lipide mit größerem Anteil an ungesättigten Fettsäuren produzieren als auf Glukose-Medium. Die Temperatur hatte im gewählten Bereich dagegen keinen nennenswerten Einfluss.

Somit kann anhand der Raman-Spektren einzelner Lipid-Vesikel der Sättigungsgrad einer Pilzprobe schnell und akkurat bestimmt werden. Dies ermöglicht eine schnelle und gleichzeitig quantitative Abschätzung, welchen Einfluss verschiedene Faktoren auf die Lipidzusammensetzung haben.

In dieser Arbeit wurden die Auswirkung von Umwelteinflüssen auf Mikroben mit Hilfe der Raman-Mikrospektroskopie untersucht. Zwei verschiedene externe Stressfaktoren wurden analysiert: Zum Einen wurde nachgewiesen, dass Bakterien selbst unter antibiotischem Stress Raman-spektroskopisch identifiziert werden können und wie deren Erkennung weiter verbessert werden kann. Zum Anderen wurde mit derselben Methode der Sättigungsgrad von Lipiden in Pilzen der Gattung *Mortierella* ortsaufgelöst und quantitativ bestimmt. Während die korrekte Bestimmung antibiotisch gestresster Bakterien ein wichtiger Schritt hin zur klinischen Anwendbarkeit der Raman-spektroskopischen Pathogen-Identifizierung ist, vereinfacht die gezeigte schnelle und einfache Lipidanalyse an intakten Mikroben die Suche nach Organismen, um vielfach ungesättigte Fettsäuren industriell zu gewinnen.

1.5 Conclusions

Due to the manifold interactions with their environment microorganisms have developed a variety of techniques to meet the challenges of this environment. These abilities represent an enormous treasure trove of functions and substances that could be of great use for us humans. However, in order to be able to exploit these abilities and resources, it is necessary to investigate the reaction of microbes to different external stimuli. The aim of the present work was to analyze the influence of two different environmental factors on bacteria or fungi using Raman spectroscopy.

The first part of this work deals with the influence that antibioticly induced stress has on bacteria of the genus *Pseudomonas* and *Escherichia*. The focus was on the question, to which extent the antibiotic stress alters the bacterial cells and their Raman spectra, motivated by the potential application of Raman spectroscopy in medical diagnostics. Four bacterial groups were cultivated with and without antibiotic influence and subsequently single bacterial cells were analyzed using Raman microspectroscopy.

Using linear discriminant analysis the four groups were distinguished on different taxonomic levels. In a first approach only spectra of untreated bacteria were used to establish a classification model. With this model, up to 97% of the bacteria from independent samples could be identified based on their Raman spectra despite their treatment with different antibiotics. However, the applied antibiotics had a varying impact on the identifiability. By including antibioticly stressed bacteria into the database used for model training the recognition rate for treated bacteria could be increased.

Further experiments have shown, that the concentration of the applied antibiotic had no discernible influence on the bacterial identification. Even unknown strains were correctly identified despite having been subjected to varying antibiotic concentrations in their growth medium. The analysis of the pathogenic species *P. aeruginosa* under identical conditions showed that from a spectroscopic point of view pathogens react very similar to antibiotic stress as apathogenic bacteria. This allows the transfer of these findings to medical applications. Therefore, it was shown that even antibioticly stressed bacteria can also be identified based on their Raman spectra. However, for better recognition of the species this stress should be included in the model.

In the second part of this work the influence of positive stress due to excess carbon availability was investigated using filamentous fungi of the genus *Mortierella*. To this end, these oleaginous fungi were grown under various conditions and the produced lipid droplets were analyzed spectroscopically. Based on the Raman spectra the degree

of unsaturation was determined for the lipids.

Due to the high spatial resolution of Raman microspectroscopy the single lipid vesicles could be investigated directly inside the intact hyphae. This allows a spatially resolved analysis of the lipid droplets in the mycelium. It was shown that the degree of unsaturation is constant throughout large parts of the mycelium. Only in a section of approximately 600 μm directly behind the hyphal tips a high variability of the degree of unsaturation was observed. Other morphological structures such as branching points or anastomoses were found to have no influence.

The degree of unsaturation was determined quantitatively via Raman spectroscopy for six *Mortierella* species and the results were validated by gas chromatographic measurements. For all tested growth conditions the values determined with both methods were equivalent. It was shown, that the species produced lipids with a higher amount of unsaturated fatty acids when grown on glycerin medium in comparison to growth on glucose medium. Variation of growth temperature in the applied range was found to have no noteworthy impact.

Hence, Raman spectra of single lipid vesicles in intact hyphae allow the fast and accurate determination of the degree of unsaturation for a fungal sample. This enables a simultaneously rapid and quantitative estimation of the influence that different growth factors have on the lipid composition.

In this work the effects of environmental influences on microbes have been studied with Raman microspectroscopy. Two different external stress factors were analyzed: Firstly, it was shown that even under antibiotic stress bacteria can be identified spectroscopically from Raman measurements and how their recognition may be enhanced. Secondly, with the same method the degree of unsaturation was determined in a spatially resolved and quantitative manner for lipids from fungi of the genus *Mortierella*. While the accurate identification of antibioticly stressed bacteria is an important step towards the clinical applicability of Raman spectroscopic pathogen identification, the presented fast and easy lipid analysis in intact microbes facilitates the search for organisms applicable in the industrial production of polyunsaturated fatty acids.

Literaturverzeichnis

- [1] P. Gaudet, J. Williams, P. Fey, R. Chisholm, *BMC Genomics* **2008**, *9*, 130.
- [2] P. Burlinson, D. Studholme, J. Cambray-Young, D. Heavens, J. Rathjen, J. Hodgkin, G. M. Preston, *ISME J* **2013**, *7*, 1126–1138.
- [3] M. Clarke, *Cellular Microbiology* **2010**, *12*, 283–291.
- [4] M. Mazzola, I. de Bruijn, M. F. Cohen, J. M. Raaijmakers, *Applied and Environmental Microbiology* **2009**, *75*, 6804–6811.
- [5] D. A. Hopwood, *Streptomyces in Nature and Medicine: The Antibiotic Makers*, Oxford University Press **2007**.
- [6] O. Gleeson, F. O’Gara, J. P. Morrissey, *Antonie van Leeuwenhoek* **2010**, *97*, 261–273.
- [7] M. A. de Waard, A. C. Andrade, K. Hayashi, H.-J. Schoonbeek, I. Stergiopoulos, L.-H. Zwieters, *Pest Management Science* **2006**, *62*, 195–207.
- [8] G. D. Wright, *Antibiotics: bacterial resistance* in T. P. Begley (Editor), *Encyclopedia of Chemical Biology*, volume 1, John Wiley & Sons, Inc. **2009**, 71–89.
- [9] U. Groß, *Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 2 edition **2009**.
- [10] L. J. Holcombe, G. McAlester, C. A. Munro, B. Enjalbert, A. J. P. Brown, N. A. R. Gow, C. Ding, G. Butler, F. O’Gara, J. P. Morrissey, *Microbiology* **2010**, *156*, 1476–1486.
- [11] D. J. Stickler, *Nature Clinical Practice Urology* **2008**, *5*, 598–608.
- [12] F. Fabretti, J. Huebner, *International Journal of Artificial Organs* **2005**, *28*, 1079–1090.
- [13] J. W. Costerton, L. Montanaro, C. R. Arciola, *International Journal of Artificial Organs* **2005**, *28*, 1062–1068.
- [14] C. C. König, K. Scherlach, V. Schroeckh, F. Horn, S. Nietzsche, A. A. Brakhage, C. Hertweck, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 938–942.
- [15] S. Cîntă Pînzaru, I. Pavel, N. Leopold, W. Kiefer, *Journal of Raman Spectroscopy* **2004**, *35*, 338–346.
- [16] S. Uskoković-Marković, M. Jelikić-Stankov, I. Holclajtner-Antunović, P. Đurđević, *Journal of Medical Biochemistry* **2013**, *32*, 96–103.
- [17] R. M. El-Abassy, P. Donfack, A. Materny, *Journal of Raman Spectroscopy* **2009**, *40*, 1284–1289.

- [18] M. Schmitt, J. Popp, *Journal of Raman Spectroscopy* **2006**, *37*, 20–28.
- [19] R. Manoharan, E. Ghiamati, R. A. Dalterio, K. A. Britton, W. H. Nelson, J. F. Sperry, *Journal of Microbiological Methods* **1990**, *11*, 1–15.
- [20] K. A. Britton, R. A. Dalterio, W. H. Nelson, D. Britt, J. F. Sperry, *Applied Spectroscopy* **1988**, *42*, 782–788.
- [21] B. Robert, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1990**, *1017*, 99–111.
- [22] K. Danzer, H. Hobert, C. Fischbacher, K.-U. Jagemann, *Chemometrik Grundlagen und Anwendung*, Springer-Verlag Berlin **2001**.
- [23] H. Hahn, S. H. E. Kaufmann, T. F. Schulz, S. Suerbaum (Editors) *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, Springer Medizin Verlag Heidelberg, 6 edition **2009**.
- [24] H. Cypionka, *Grundlagen der Mikrobiologie*, Springer-Lehrbuch, Springer, Springer Heidelberg Dordrecht London New York, 4 edition **2010**.
- [25] A. Croxatto, G. Prod'hom, G. Greub, *FEMS Microbiology Reviews* **2012**, *36*, 380–407.
- [26] A. Wieser, L. Schneider, J. Jung, S. Schubert, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2012**, *93*, 965–974.
- [27] B. W. Buchan, K. M. Riebe, N. A. Ledebner, *Journal of Clinical Microbiology* **2012**, *50*, 346–352.
- [28] A. Ferroni, S. Suarez, J.-L. Beretti, B. Dauphin, E. Bille, J. Meyer, M.-E. Bougnoux, A. Alanio, P. Berche, X. Nassif, *Journal of Clinical Microbiology* **2010**, *48*, 1542–1548.
- [29] L. Ferreira, F. Sanchez-Juanes, M. Gonzalez-Avila, D. Cembrero-Fucinos, A. Herrero-Hernandez, J. M. Gonzalez-Buitrago, J. L. Munoz-Bellido, *Journal of Clinical Microbiology* **2010**, *48*, 2110–2115.
- [30] M. Christner, H. Rohde, M. Wolters, I. Sobottka, K. Wegscheider, M. Aepfelbacher, *Journal of Clinical Microbiology* **2010**, *48*, 1584–1591.
- [31] P. R. S. Lagacé-Wiens, H. J. Adam, J. A. Karlowsky, K. A. Nichol, P. F. Pang, J. Guenther, A. A. Webb, C. Miller, M. J. Alfa, *Journal of Clinical Microbiology* **2012**, *50*, 3324–3328.
- [32] G. Lisby, *Molecular Biotechnology* **1999**, *12*, 75–99.
- [33] E. J. Kaleta, A. E. Clark, D. R. Johnson, D. C. Gamage, V. H. Wysocki, A. Cherkaoui, J. Schrenzel, D. M. Wolk, *Journal of Clinical Microbiology* **2010**, *49*, 345–353.
- [34] R. Zhang, H. Gong, X. Zeng, C. Lou, C. C. Sze, *Analytical Chemistry* **2013**, *85*, 1484–1491.
- [35] E. A. Ottesen, J. W. Hong, S. R. Quake, J. R. Leadbetter, *Science* **2006**, *314*, 1464–1467.
- [36] M. Beekes, P. Lasch, D. Naumann, *Veterinary Microbiology* **2007**, *123*, 305–319.
- [37] M. Harz, P. Rösch, J. Popp, *Cytometry Part A* **2009**, *75A*, 104–113.
- [38] E. Kastanos, A. Kyriakides, K. Hadjigeorgiou, C. Pitris, *International Journal of Spectroscopy* **2012**, *2012*, Article ID 195317.

- [39] K. Maquelin, C. Kirschner, L. P. Choo-Smith, N. van den Braak, H. P. Endtz, D. Naumann, G. J. Puppels, *Journal of Microbiological Methods* **2002**, *51*, 255–271.
- [40] X. Lu, Q. Huang, W. G. Miller, D. E. Aston, J. Xu, F. Xue, H. Zhang, B. A. Rasco, S. Wang, M. E. Konkel, *Journal of Clinical Microbiology* **2012**, *50*, 2932–2946.
- [41] E. K. Kastanos, A. Kyriakides, K. Hadjigeorgiou, C. Pitris, *Journal of Raman Spectroscopy* **2009**, *41*, 958–963.
- [42] M. Wenning, N. R. Büchl, S. Scherer, *Journal of Biophotonics* **2010**, *3*, 493–505.
- [43] A. Bosch, A. Miñán, C. Vescina, J. Degrossi, B. Gatti, P. Montanaro, M. Messina, M. Franco, C. Vay, J. Schmitt, D. Naumann, O. Yantorno, *Journal of Clinical Microbiology* **2008**, *46*, 2535–2546.
- [44] S. Kloß, B. Kampe, S. Sachse, P. Roesch, E. Straube, W. Pfister, M. Kiehntopf, J. Popp, *Analytical Chemistry* **2013**, *85*, 9610–9616.
- [45] S. Meisel, S. Stöckel, P. Rösch, J. Popp, *Food Microbiology* **2014**, *38*, 36–43.
- [46] S. Stöckel, S. Meisel, M. Elschner, P. Rösch, J. Popp, *Analytical Chemistry* **2012**, *84*, 9873–9880.
- [47] A. Walter, W. Schumacher, T. Bocklitz, M. Reinicke, P. Rösch, E. Kothe, J. Popp, *Applied Spectroscopy* **2011**, *65*, 1116–1125.
- [48] V. Ciobotă, E.-M. Burkhardt, W. Schumacher, P. Rösch, K. Küsel, J. Popp, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, *397*, 2929–2937.
- [49] S. Stöckel, S. Meisel, R. Böhme, M. Elschner, P. Rösch, J. Popp, *Journal of Raman Spectroscopy* **2009**, *40*, 1469–1477.
- [50] L. Kong, P. Zhang, P. Setlow, Y.-Q. Li, *Analytical Chemistry* **2010**, *82*, 3840–3847.
- [51] M. F. Escoriza, J. M. VanBriesen, S. Stewart, J. Maier, *Applied Spectroscopy* **2006**, *60*, 971–976.
- [52] U. Neugebauer, U. Schmid, K. Baumann, U. Holzgrabe, W. Ziebuhr, S. Kozitskaya, W. Kiefer, M. Schmitt, J. Popp, *Biopolymers* **2006**, *82*, 306–311.
- [53] T. J. Moritz, D. S. Taylor, C. R. Polage, D. M. Krol, S. M. Lane, J. W. Chan, *Analytical Chemistry* **2010**, *82*, 2703–2710.
- [54] W. E. Huang, R. I. Griffiths, I. P. Thompson, M. J. Bailey, A. S. Whiteley, *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, 4452–4458.
- [55] D. Hutsebaut, K. Maquelin, P. de Vos, P. Vandenabeele, L. Moens, G. J. Puppels, *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, 6274–6281.
- [56] L. P. Choo-Smith, K. Maquelin, T. van Vreeswijk, H. A. Bruining, G. J. Puppels, N. A. N. Thi, C. Kirschner, D. Naumann, D. Ami, A. M. Villa, F. Orsini, S. M. Doglia, H. Lamfarraj, G. D. Sockalingum, M. Manfait, P. Allouch, H. P. Endtz, *Applied and Environmental Microbiology* **2001**, *67*, 1461–1469.
- [57] J. R. Goodwin, L. M. Hafner, P. M. Fredericks, *Journal of Raman Spectroscopy* **2006**, *37*, 932–936.
- [58] M. F. Escoriza, J. M. VanBriesen, S. Stewart, J. Maier, *Applied Spectroscopy* **2007**, *61*, 812–823.

- [59] S. Stöckel, W. Schumacher, S. Meisel, M. Elschner, P. Rösch, J. Popp, *Applied and Environmental Microbiology* **2010**, *76*, 2895–2907.
- [60] A. Walter, S. Kuhri, M. Reinicke, T. Bocklitz, W. Schumacher, P. Rösch, D. Merten, G. Büchel, E. Kothe, J. Popp, *Journal of Raman Spectroscopy* **2011**, *43*, 1058–1064.
- [61] E. C. López-Díez, C. L. Winder, L. Ashton, F. Currie, R. Goodacre, *Analytical Chemistry* **2005**, *77*, 2901–2906.
- [62] T. J. Moritz, C. R. Polage, D. S. Taylor, D. M. Krol, S. M. Lane, J. W. Chan, *Journal of Clinical Microbiology* **2010**, *48*, 4287–4290.
- [63] J. Preiss, *Glycogen Synthesis and its Regulation in Bacteria* in A. Steinbüchel (Editor), *Biopolymers Online*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA **2005**.
- [64] N. Thomson, D. Summers, E. Sivaniah, *Soft Matter* **2010**, *6*, 4045–4057.
- [65] G. Lee, J. Na, *Microbial Cell Factories* **2013**, *12*, 54.
- [66] H. N. Schulz, B. B. Jørgensen, *Annual Review of Microbiology* **2001**, *55*, 105–137.
- [67] J. Preiss, *Annual Review of Microbiology* **1984**, *38*, 419–458.
- [68] T. Ishige, A. Tani, Y. Sakai, N. Kato, *Current Opinion in Microbiology* **2003**, *6*, 244–250.
- [69] E. J. Bormann, M. Leißner, M. Roth, B. Beer, K. Metzner, *Applied Microbiology and Biotechnology* **1998**, *50*, 604–607.
- [70] R. C. Tappel, C. T. Nomura, *Recent Advances in Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis in Escherichia coli* in *Degradable Polymers and Materials: Principles and Practice (2nd Edition)*, volume 1114 of *ACS Symposium Series*, American Chemical Society **2012**, 141–156.
- [71] S. J. Park, T. W. Kim, M. K. Kim, S. Y. Lee, S.-C. Lim, *Biotechnology Advances* **2012**, *30*, 1196–1206.
- [72] C. Ratledge, *Biochimie* **2004**, *86*, 807–815.
- [73] S. Fakas, S. Papanikolaou, A. Batsos, M. Galiotou-Panayotou, A. Mallouchos, G. Aggelis, *Biomass and Bioenergy* **2009**, *33*, 573–580.
- [74] A. Gil, M. Ramirez, M. Gil, *European Journal of Clinical Nutrition* **2003**, *57*, S31–S34.
- [75] R. Uauy, P. Mena, P. Peirano, *Dietary polyunsaturated fatty acids for optimal neurodevelopment: recommendations for perinatal nutrition* in A. Bendich, R. J. Deckelbaum (Editors), *Preventive Nutrition*, volume 2, Humana Press Inc. Totowa, N. J **2001**, 415–431.
- [76] O. P. Ward, A. Singh, *Process Biochemistry* **2005**, *40*, 3627–3652.
- [77] U. Gogus, C. Smith, *International Journal of Food Science and Technology* **2010**, *45*, 417–436.
- [78] W. Kim, D. N. McMurray, R. S. Chapkin, *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **2010**, *82*, 155–158.
- [79] J. V. Patel, I. Tracey, E. A. Hughes, G. Y. H. Lip, *Vascular Health and Risk Management* **2009**, *5*, 801–810.

- [80] L. R. Mehta, R. H. Dworkin, S. R. Schwid, *Nature Clinical Practice Neurology* **2009**, *5*, 82–92.
- [81] F. S. Kenny, S. E. Pinder, I. O. Ellis, J. M. W. Gee, R. I. Nicholson, R. P. Bryce, J. F. R. Robertson, *International Journal of Cancer* **2000**, *85*, 643–648.
- [82] A. Pontes-Arruda, L. Martins, S. de Lima, A. Isola, D. Toledo, E. Rezende, M. Maia, G. Magnan, G. the Investigating Nutritional Therapy with EPA, A. R. i. S. T. S. Group, *Critical Care* **2011**, *15*, R144.
- [83] J. Arct, K. Pytkowska, *SOFW Journal* **2003**, *129*, 2–4.
- [84] K. J. Lee Chang, P. D. Nichols, S. I. Blackburn, *Lipid Technology* **2013**, *25*, 199–203.
- [85] A. Nisha, N. Rastogi, G. Venkateswaran, *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **2011**, *16*, 229–237.
- [86] M. Certik, S. Shimizu, *Journal of Bioscience and Bioengineering* **1999**, *87*, 1–14.
- [87] E. Dedyukhina, T. Chistyakova, M. Vainshtein, *Applied Biochemistry and Microbiology* **2011**, *47*, 109–117.
- [88] C. Jacobsen, M. Timm-Heinrich, N. S. Nielsen, *Application of functional lipids in foods* in F. Shahidi (Editor), *Nutraceutical and Specialty Lipids and Their Co-Products*, volume 5 of *Nutraceutical Science and Technology*, CRC Press LLC **2006**, 341–364.
- [89] X. Meng, J. Yang, X. Xu, L. Zhang, Q. Nie, M. Xian, *Renewable Energy* **2009**, *34*, 1–5.
- [90] Z. Ruan, M. Zanotti, X. Wang, C. Ducey, Y. Liu, *Bioresource Technology* **2012**, *110*, 198–205.
- [91] E. Sakuradani, S. Shimizu, *Journal of Biotechnology* **2009**, *144*, 31–36.
- [92] H. M. Alvarez, F. Mayer, D. Fabritius, A. Steinbüchel, *Archives of Microbiology* **1996**, *165*, 377–386.
- [93] C. Huang, X.-F. Chen, L. Xiong, X.-D. Chen, L.-L. Ma, Y. Chen, *Biotechnology Advances* **2013**, *31*, 129–139.
- [94] C. Ratledge, Z. Cohen, *Lipid Technology* **2008**, *20*, 155–160.
- [95] S. Papanikolaou, G. Aggelis, *Lipid Technology* **2009**, *21*, 83–87.
- [96] Q. Li, W. Du, D. Liu, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2008**, *80*, 749–756.
- [97] S.-Y. Ho, Y. Jiang, F. Chen, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55*, 3960–3966.
- [98] S. D. Dyal, S. S. Narine, *Food Research International* **2005**, *38*, 445–467.
- [99] N. Totani, K. Oba, *Lipids* **1987**, *22*, 1060–1062.
- [100] R. W. Nicol, K. Marchand, W. D. Lubitz, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2012**, *93*, 1865–1875.
- [101] M. Certik, S. Shimizu, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2000**, *54*, 224–230.
- [102] S. D. Dyal, L. Bouzidi, S. S. Narine, *Food Research International* **2005**, *38*, 815–829.

- [103] S. Fakas, A. Makri, M. Mavromati, M. Tselepi, G. Aggelis, *Bioresource Technology* **2009**, *100*, 6118–6120.
- [104] C. Hou, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **2008**, *35*, 501–506.
- [105] H.-D. Jang, Y.-Y. Lin, S.-S. Yang, *Bioresource Technology* **2005**, *96*, 1633–1644.
- [106] Y. Shinmen, S. Shimizu, K. Akimoto, H. Kawashima, H. Yamada, *Applied Microbiology and Biotechnology* **1989**, *31*, 11–16.
- [107] S. Shimizu, H. Kawashima, K. Akimoto, Y. Shinmen, H. Yamada, *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1989**, *66*, 342–347.
- [108] D. Gao, J. Zeng, Y. Zheng, X. Yu, S. Chen, *Bioresource Technology* **2013**, *133*, 315–321.
- [109] J. Zeng, Y. Zheng, X. Yu, L. Yu, D. Gao, S. Chen, *Bioresource Technology* **2013**, *128*, 385–391.
- [110] J. Sajbidor, M. Certík, S. Dobroňová, *Biotechnology Letters* **1988**, *10*, 347–350.
- [111] A. Chatzifragkou, A. Makri, A. Belka, S. Bellou, M. Mavrou, M. Mastoridou, P. Mystrioti, G. Onjaro, G. Aggelis, S. Papanikolaou, *Energy* **2011**, *36*, 1097–1108.
- [112] H.-D. Jang, Y.-Y. Lin, S.-S. Yang, *Botanical Bulletin of Academia Sinica* **2000**, *41*, 41–48.
- [113] S. Chaudhuri, S. Ghosh, D. K. Bhattacharyya, S. Bandyopadhyay, *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1998**, *75*, 1053–1055.
- [114] C. N. Economou, G. Aggelis, S. Pavlou, D. V. Vayenas, *Bioresource Technology* **2011**, *102*, 9737–9742.
- [115] C. Strobel, G. Jahreis, K. Kuhnt, *Lipids in Health and Disease* **2012**, *11*, 144.
- [116] J. Folch, M. Lees, G. H. Sloane Stanley, *Journal of Biological Chemistry* **1957**, *226*, 497–509.
- [117] J. J. Mueller, S. Baum, L. Hilterhaus, M. Eckstein, O. Thum, A. Liese, *Analytical Chemistry* **2011**, *83*, 9321–9327.
- [118] C. Hellmuth, M. Weber, B. Koletzko, W. Peissner, *Analytical Chemistry* **2012**, *84*, 1483–1490.
- [119] M. C. Thomas, S. R. Dunn, J. Altvater, S. G. Dove, G. W. Nette, *Analytical Chemistry* **2012**, *84*, 5976–5983.
- [120] P. Samyn, D. van Nieuwerkerke, G. Schoukens, L. Vonck, D. Stanssens, H. van den Aabbeele, *Applied Spectroscopy* **2012**, *66*, 552–565.
- [121] O. Samek, A. Jonás, Z. Pilát, P. Zemánek, L. Nedbal, J. Tríska, P. Kotas, M. Trtílek, *Sensors* **2010**, *10*, 8635–8651.
- [122] I. W. Schie, L. Nolte, T. L. Pedersen, Z. Smith, J. Wu, I. Yahiatene, J. W. Newman, T. Huser, *Analyst* **2013**, *138*, 6662–6670.
- [123] L. B. Lyndgaard, K. M. Sørensen, F. van den Berg, S. B. Engelsen, *Journal of Raman Spectroscopy* **2012**, *43*, 482–489.
- [124] D. Gode, D. A. Volmer, *Analyst* **2013**, *138*, 1289–1315.

- [125] S. R. Ellis, C. J. Ferris, K. J. Gilmore, T. W. Mitchell, S. J. Blanksby, M. in het Panhuis, *Analytical Chemistry* **2012**, *84*, 9679–9683.
- [126] S. F. Graham, S. A. Haughey, R. M. Ervin, E. Cancouët, S. Bell, C. T. Elliott, *Food Chemistry* **2012**, *132*, 1614–1619.
- [127] X.-F. Zhang, M.-Q. Zou, X.-H. Qi, F. Liu, C. Zhang, F. Yin, *Journal of Raman Spectroscopy* **2011**, *42*, 1784–1788.
- [128] C. A. Nunes, *Food Research International* **2014**, *60*, 255–261.
- [129] H. Schulz, M. Baranska, *Vibrational Spectroscopy* **2007**, *43*, 13–25.
- [130] O. Samek, P. Zemánek, A. Jonáš, H. H. Telle, *Laser Physics Letters* **2011**, *8*, 701–709.
- [131] Y.-M. Weng, R.-H. Weng, C.-Y. Tzeng, W. Chen, *Applied Spectroscopy* **2003**, *57*, 413–418.
- [132] O. Samek, P. Zemánek, S. Bernatov, Z. Pilát, H. H. Telle, *Spectroscopy Europe* **2012**, *24*, 22–25.
- [133] H. Wu, J. V. Volponi, A. E. Oliver, A. N. Parikh, B. A. Simmons, S. Singh, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2011**, *108*, 3809–3814.
- [134] R. M. El-Abassy, P. J. Eeravuchira, P. Donfack, B. Von Der Kammer, A. Materny, *Applied Spectroscopy* **2012**, *66*, 538–544.
- [135] N. K. Afseth, J. P. Wold, V. H. Segtnan, *Analytica Chimica Acta* **2006**, *572*, 85–92.
- [136] M. Giarola, B. Rossi, E. Mosconi, M. Fontanella, P. Marzola, I. Scambi, A. Sbarbati, G. Mariotto, *Lipids* **2011**, *46*, 659–667.
- [137] B. Muik, B. Lendl, A. Molina-Díaz, M. J. Ayora-Canada, *Chemistry and Physics of Lipids* **2005**, *134*, 173–182.
- [138] S. Reitzenstein, P. Rösch, M. A. Strehle, D. Berg, M. Baranska, H. Schulz, E. Rudloff, J. Popp, *Journal of Raman Spectroscopy* **2007**, *38*, 301–308.
- [139] H. Sadeghi-Jorabchi, P. Hendra, R. Wilson, P. Belton, *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1990**, *67*, 483–486.
- [140] J. Vongsivut, P. Heraud, A. Gupta, M. Puri, D. McNaughton, C. J. Barrow, *Analyst* **2013**, *138*, 6016–6031.
- [141] U. Neugebauer, *Characterization of bacteria, antibiotics of the fluoroquinolone type and their biological targets DNA and gyrase utilizing the unique potential of vibrational spectroscopy*, Ph.D. thesis, Friedrich-Schiller-Universität **2007**.
- [142] H. Sadeghi-Jorabchi, R. H. Wilson, P. S. Belton, J. D. Edwards-Webb, D. T. Coxon, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy* **1991**, *47*, 1449–1458.
- [143] R. Korifi, Y. Le Dréau, J. Molinet, J. Artaud, N. Dupuy, *Journal of Raman Spectroscopy* **2011**, *42*, 1540–1547.
- [144] B. Muik, B. Lendl, A. Molina-Díaz, M. J. Ayora-Canada, *Analytica Chimica Acta* **2003**, *487*, 211–220.

- [145] A. Walter, S. Erdmann, T. Bocklitz, E.-M. Jung, N. Vogler, D. Akimov, B. Dietzek, P. Rösch, E. Kothe, J. Popp, *Analyst* **2010**, *135*, 908–917.
- [146] S. Shimizu, Y. Shinmen, H. Kawashima, K. Akimoto, H. Yamada, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1988**, *150*, 335–341.
- [147] C. Peng, H. Huang, X. Ji, X. Liu, J. You, J. Lu, L. Cong, X. Xu, P. Ouyang, *Biochemical Engineering Journal* **2010**, *53*, 92–96.
- [148] K. Laoteng, M. Certik, S. Cheevadhanark, *Chemical Papers* **2011**, *65*, 97–103.
- [149] C. Schimek, J. Wöstemeyer, *Pheromone action in the fungal groups Chytridiomycota and Zygomycota, and in the Oomycota* in K. Esser (Editor), *The Mycota I: Growth, Differentiation and Sexuality*, volume 1 of *The Mycota*, Springer, Heidelberg, 2 edition **2006**, 215–231.
- [150] G. W. Gooday, *Hormones in Mycelial Fungi* in J. H. Wessels, F. Meinhardt (Editors), *Growth, Differentiation and Sexuality*, volume 1 of *The Mycota*, Springer Berlin Heidelberg **1994**, 401–411.

Kapitel 2

Veröffentlichungen

2.1 Raman-spectroscopic identification of single bacterial cells under antibiotic influence [UM01]

Analytical and Bioanalytical Chemistry, 406, pp. 3041-3050, Copyright 2014.

Autorenschaft

Ute Münchberg Planung der Untersuchungen
Kultivierung und Aufarbeitung der Mikroorganismen
Raman-Messungen
Analyse und Auswertung der Daten
Erstellen des Manuskriptes

Petra Rösch Planung der Untersuchungen
Konzept- und Ergebnisdiskussion
Revision und Überarbeitung des Manuskripts

Michael Bauer Konzept- und Ergebnisdiskussion
Revision und Überarbeitung des Manuskripts

Jürgen Popp Projektleitung
Konzept- und Ergebnisdiskussion
Revision und Überarbeitung des Manuskripts

Autor Ute Münchberg
Publikationsäquivalente 1,0

Der Nachdruck der folgenden Publikation erscheint mit freundlicher Genehmigung von *Springer Science and Business Media*.

Anal Bioanal Chem (2014) 406:3041–3050
DOI 10.1007/s00216-014-7747-2

RESEARCH PAPER

Raman spectroscopic identification of single bacterial cells under antibiotic influence

Ute Münchberg · Petra Rösch · Michael Bauer ·
Jürgen Popp

Received: 13 December 2013 / Revised: 12 February 2014 / Accepted: 4 March 2014 / Published online: 21 March 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract The identification of pathogenic bacteria is a frequently required task. Current identification procedures are usually either time-consuming due to necessary cultivation steps or expensive and demanding in their application. Furthermore, previous treatment of a patient with antibiotics often renders routine analysis by culturing difficult. Since Raman microspectroscopy allows for the identification of single bacterial cells, it can be used to identify such difficult to culture bacteria. Yet until now, there have been no investigations whether antibiotic treatment of the bacteria influences the Raman spectroscopic identification. This study aims to rapidly identify bacteria that have been subjected to antibiotic

treatment on single cell level with Raman microspectroscopy. Two strains of *Escherichia coli* and two species of *Pseudomonas* have been treated with four antibiotics, all targeting different sites of the bacteria. With Raman spectra from untreated bacteria, a linear discriminant analysis (LDA) model is built, which successfully identifies the species of independent untreated bacteria. Upon treatment of the bacteria with subinhibitory concentrations of ampicillin, ciprofloxacin, gentamicin, and sulfamethoxazole, the LDA model achieves species identification accuracies of 85.4, 95.3, 89.9, and 97.3 %, respectively. Increasing the antibiotic concentrations has no effect on the identification performance. An ampicillin-resistant strain of *E. coli* and a sample of *P. aeruginosa* are successfully identified as well. General representation of antibiotic stress in the training data improves species identification performance, while representation of a specific antibiotic improves strain distinction capability. In conclusion, the identification of antibiotically treated bacteria is possible with Raman microspectroscopy for diverse antibiotics on single cell level.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00216-014-7747-2) contains supplementary material, which is available to authorized users.

U. Münchberg · P. Rösch · J. Popp (✉)
Institute of Physical Chemistry, Helmholtzweg 4, Friedrich Schiller
University Jena, 07743 Jena, Germany
e-mail: juergen.popp@uni-jena.de

U. Münchberg
Jena School for Microbial Communication, Friedrich Schiller
University Jena, Neugasse 23, 07743 Jena, Germany

U. Münchberg · M. Bauer · J. Popp
Abbe Center of Photonics, Friedrich Schiller University Jena,
Max-Wien-Platz 1, 07743 Jena, Germany

M. Bauer
Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine,
Erlanger Allee 101, University Hospital Jena, 07747 Jena, Germany

M. Bauer · J. Popp
Center for Sepsis Control and Care, University Hospital Jena,
Erlanger Allee 101, 07747 Jena, Germany

J. Popp
Leibniz-Institute of Photonic Technology, Albert-Einstein-Str. 9,
07745 Jena, Germany

Keywords Single cell analysis · Bacterial classification ·
Pseudomonas stutzeri · *Pseudomonas thermotolerans* ·
Raman spectroscopy

Introduction

Infectious diseases in general pose serious health problems worldwide. Increasing antimicrobial resistances further aggravate the situation [1]. They result in part from excessive or ineffective application of antibiotics. For ensuring the optimal patient treatment with antimicrobials and at the same time reducing the risk of resistance development, a reliable pathogen identification is necessary. A recent study by Hranjec and colleagues has shown that the initiation of correct treatment,

even if its application is delayed, results in a decreased mortality compared to immediate “aggressive” antibiotic treatment [2]. However, for critically ill patients with fast-progressing or severe diseases such as sepsis, a delayed medication is often unacceptable. Rapid and accurate pathogen identification and subsequent adequate antibiotic treatment can save lives here [3–5].

Current pathogen identification is routinely achieved by microbiological methods, which require multiple cultivation steps and can take up to several days before the identification result is available [5, 6]. Numerous efforts have been made aiming at a faster identification of microorganisms. A promising technique is polymerase chain reaction (PCR), since it can detect multiple microorganisms at once and even has the potential to detect single cells [7, 8]. However, the need for species-specific probes, which might not even be available for certain organisms as well as contamination issues make PCR a demanding technique. Furthermore, in routine analysis, PCR is mostly performed on isolated colonies, which still requires previous cultivation [9].

In recent years, the identification via matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF) spectrometry has attracted considerable interest as is reflected in numerous reviews on the subject [10, 11]. Although identification is achieved for solid cultures from different media with good to excellent results [12] and even identification directly from positive blood cultures is possible [11, 13], the method is not suited for mixed samples [6, 10, 14]. Furthermore, MALDI-TOF still requires prior cultivation, but in addition also is strongly dependent on the initial blood culture as well as the sample preparation procedure [14, 15].

An alternative method of identification can be vibrational spectroscopy, that is, infrared (IR) absorption or Raman spectroscopy. Vibrational spectroscopy excites molecular vibrations whose frequencies depend on the type of chemical bonds and atoms involved in the molecular vibrations and on the local chemical environment; that is why each substance has a unique vibrational spectral pattern. The vibrational spectrum of biological samples like cells or tissue is the result of a superposition of the vibrational information of their molecular constituents (e.g., DNA, proteins, lipids, etc.). Thus, recording the whole biological composition of the sample results in a phenotypic, fingerprint-like vibrational spectrum.

In recent years, numerous studies have shown that both, IR absorption [16–19] and Raman spectroscopy [18, 20–31] have the potential to distinguish between different microorganisms even down to the strain level. Since water has intense spectroscopic signals in IR spectra but only very weak signals in Raman spectra, Raman spectroscopy is particularly well suited to investigate living organisms, as it is also non-destructive. First investigations of microorganisms with Raman spectroscopy used bulk samples [21, 22], but the investigation and even identification of single microorganisms with Raman

microspectroscopy is possible as well and has gained increasing attention over the last years [20, 23, 26–30].

The identification of new samples is achieved by comparing their Raman spectra to a database of reference spectra. The potential of Raman microspectroscopy to investigate single bacterial cells allows for the direct application of the method to bacterial samples without the need to cultivate. It has been proven that bacteria from a patient sample could be identified with this method without any prior cultivation of the patient sample [20, 23]. In combination with isolation techniques such as filtering, magnetic bead separation, or special centrifugation [30] to separate the bacteria from a matrix, this would allow to directly identify bacteria from patient samples.

In routine diagnostics, the identification task may be further complicated by previous antibiotic treatment. Once an antimicrobial therapeutic has been given to a patient, the gold standard for identification—positive blood cultures—is much more difficult to obtain [32, 33]. Since Raman microspectroscopy offers the possibility to identify single bacterial cells, cultivation and possible cultivation problems from antimicrobial treatment do not pose a problem for this method and would not prevent its applicability. However, the influence of the antibiotic treatment on the bacteria might be one.

Some groups investigated the influence of a single antibiotic on bacteria with Raman spectroscopy and found dose- and time-dependent differences in the spectra of treated and untreated bacteria [26, 34–37]. However, only in one study, subinhibitory concentrations of the antibiotic were administered [34], which would be comparable to the scenario of ineffectively treated patients and in none of these studies spectra were recorded from single cells. Furthermore, only one bacterial strain was investigated per study, which provides no information whether these spectral changes are large or small in comparison to the spectral difference between species and if they would hinder Raman spectroscopic identification of species.

In the present study, we want to address this latter question. For work safety reasons, we use non-pathogenic substitutes of the typical sepsis pathogens *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* and determine whether the application of subinhibitory concentrations of antibiotics interferes with the identification capability of Raman microspectroscopy. To this end, the bacteria (two strains of *E. coli*, *Pseudomonas stutzeri*, and *Pseudomonas thermotolerans*) are treated with four antibiotics with distinctly different modes of action that target different sites in the bacteria. Raman spectra from single bacteria are measured and identified using several previously trained linear discriminant analysis (LDA) models. Also, the effect of the antibiotic concentration and resistance are tested and discussed. Finally, a pathogenic strain of *P. aeruginosa* is investigated, applying the model.

Materials and methods

Chemicals For the culture media, meat extract and agar (both suitable for microbiology) were purchased from Merck, peptone from casein (tryptic digestion) from Roth. Ampicillin sodium salt was purchased from Applied Chem (Darmstadt), ciprofloxacin was obtained from Fluka, gentamicin sulfate solution (10 mg/mL gentamicin) and sulfamethoxazole were purchased from VWR. All antibiotics were of analytical standard grade or biochemical grade.

Bacteria *E. coli* DSM 423, *E. coli* DSM 498, *P. stutzeri* DSM 5190 and *P. thermotolerans* DSM 14292 were obtained from the German collection of microorganisms and cell cultures (DSMZ). *P. aeruginosa* CIP 82.118 was obtained from the Collection Institute Pasteur (CIP). *E. coli* DH5 α were transformed with plasmid pDrive and kept on solid agar plates containing 10 mg/L ampicillin [31].

For measurements, the bacteria were grown in liquid culture with standard nutrient broth (NA) (0.3 % meat extract, 0.5 % peptone) at 37 °C and 200 rpm for 16 h. Antibiotics were added to some samples prior to inoculation. Samples of *E. coli* DH5 α were only grown with ampicillin to retain the plasmid-coded resistance. Since we aim to determine the effect of antibiotic treatment on the Raman spectroscopic identification performance, we used defined, i.e., cultured samples so as to not introduce additional sample variations at this early stage of investigation.

For growth with antibiotics, the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined for each strain and antibiotic in drug dilution series (see also supporting information). The MIC of the least tolerant bacteria was taken as reference value and all bacteria were treated with half of this MIC. This corresponds to 0.5 mg/L for ampicillin, 0.0025 mg/L for ciprofloxacin, 0.025 mg/L for gentamicin and 4 mg/L for sulfamethoxazole, respectively.

All samples grown without antibiotics, with ampicillin or ciprofloxacin, were measured at least in triplicates at different days and cultivated in different medium batches to ensure complete independence. For gentamicin and sulfamethoxazole, duplicate measurements were performed and for samples of *P. aeruginosa* measurements were performed only once, since these data were used solely for identification purposes.

For Raman spectroscopic measurements, 1 mL of the culture was centrifuged (2,113 g, 5 min, 4 °C, Rotina 380R, Hettich), washed with 0.9 % sodium chloride solution and resuspended in 500–1,000 μ L distilled water depending on the pellet size. Drops of this suspension were spotted onto fused silica slides and dried at room temperature.

Raman measurements The Raman spectra were measured with a BioParticle Explorer (RapID, Berlin, Germany). The device was equipped with a frequency-doubled Nd:YAG laser

(532.11 nm, LCM-S-111-NNP25, Laser-export Co. Ltd.). The laser beam was focussed onto the sample with a $\times 100$ objective (Olympus MPLFLN 100 \times BD) with a power of approximately 7 mW applied to the single bacterial cells. Spectrum acquisition time was 20 s per cell. The Raman backscattered light was collected with the same objective at 180°. Rayleigh scattered light was removed by two edge filters. The Raman scattered light was passed through a single-stage monochromator (Horiba Jobin Yvon, HE532, 920 lines/mm) and the signal was detected with a Peltier-cooled charge coupled device camera (DV401A-BV, Andor Technology) with a spectral resolution of approximately 10 cm^{-1} in the range of -113 to 3,186 cm^{-1} .

Data treatment and statistical calculations All preprocessing and statistical analyses were carried out in the statistical language GNU R, Version 2.13.1 [38]. All spectra were preprocessed as follows: Cosmic spikes were removed from the spectra and the x-axis was corrected for wavenumber shifts by comparing the band positions of the reference compound 4-acetamidophenol to established literature values [39] according to established procedures [30]. For baseline correction, a fourth-order polynomial was fitted to the baseline in the range of 550–3,186 cm^{-1} and subtracted from the spectra. Finally, the spectra were vector normalized. For statistical analyses, at least one batch replicate was excluded from the model training always, to be used as independent test data set. The number of spectra used to build the models varied, but can be found in the classification tables in the electronic supplementary material for each model. A principal component analysis (PCA) was performed on the classification spectra and the first 20 principal components (PCs), which account for 73.5–76.6 % of the spectral variation in the different data sets, were used for LDA. The classification capability of the model was estimated with leave-one-out cross-validation. The identification data were preprocessed separately to ensure complete independence and rotated into the PCA space of the classification data by the respective PCA loadings.

Results

We grew the four bacterial representatives of our study each under several conditions. First, we cultivated them in standard nutrient broth only to represent the native state of the bacteria. For antimicrobial treatment, we added one of the antibiotics (ampicillin, ciprofloxacin, gentamicin, or sulfamethoxazole) to the cultivation broth to a final concentration of half of the MIC of the least tolerant microorganism.

Figure 1 shows the resulting mean Raman spectra for each of the bacterial taxa under investigation in their native state, i.e., grown without antibiotics. The spectra show the typical signals of biological samples at 2,933 cm^{-1} (CH_2 and CH

3044

U. Münchberg et al.

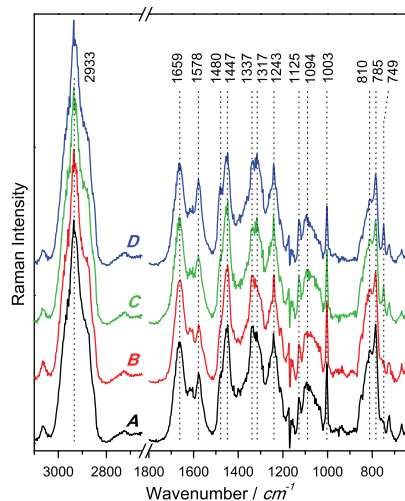


Fig. 1 Mean Raman spectra for all investigated bacteria grown without antibiotics. Spectra of *E. coli* DSM 423 (A), *E. coli* DSM 498 (B), *P. stutzeri* (C) and *P. thermotolerans* (D) are depicted in the spectroscopic range of interest and are corrected for cosmic spikes, x-axis shift and baseline before vector normalization. For each mean spectrum at least 40 spectra of single cells were averaged

groups), $1,659\text{ cm}^{-1}$ (amide I of proteins), $1,578\text{ cm}^{-1}$ (DNA/RNA), $1,447\text{ cm}^{-1}$ (C–H), $1,337\text{ cm}^{-1}$ (DNA/RNA), $1,317\text{ cm}^{-1}$, $1,243\text{ cm}^{-1}$ (amide III), $1,094\text{ cm}^{-1}$ (DNA/RNA), $1,003\text{ cm}^{-1}$ (phenylalanine in proteins) and 785 cm^{-1} (DNA/RNA) [18, 20, 24, 28, 31]. However, most signals are a superposition of bands from several compounds, since the entirety of biochemical compounds in a bacterial cell contributes to the Raman spectrum. A more detailed tentative assignment of the Raman signals can be found in the Electronic supplementary material, Table S1.

The differences in the spectra are hard to distinguish by simple visual inspection and not necessarily significant to distinguish the groups from one another. A large variability in the molecular setup between individual cells of one group may occur. Therefore, for a proper determination of group-specific variations in the spectra of single bacterial cells statistical tools are necessary. To this end, we applied the chemometric tool of LDA to our data.

Data evaluation by linear discriminant analysis We first investigated the possibility to identify untreated and antibiotically treated bacteria based on a reference database containing native samples only. For these analyses, the spectra of untreated bacteria from all replicates except one were combined. This model is referred to as model N (for native). Spectra of untreated and antibiotically treated bacteria from the left out replicate served as identification data set. Fig. 2 shows a 3D scoreplot of the LDA classification for model N. Spectra of the four different classes

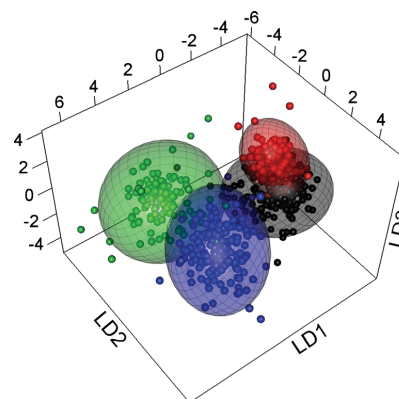


Fig. 2 LDA score plot for the classification of untreated bacteria (model N). The four classes are color-coded as follows: *E. coli* DSM 423 in black, *E. coli* DSM 498 in red, *P. stutzeri* in green, *P. thermotolerans* in blue. The ellipsoids represent the area, within which 95 % of the spectra of the respective group are found

are represented by differently colored dots (*E. coli* DSM 423 in black, *E. coli* DSM 498 in red, *P. stutzeri* DSM 5190 in green and *P. thermotolerans* DSM 14292 in blue). The spectra cluster according to their class membership in distinctly different areas of the discriminant space. The ellipsoids depict the 95 % confidence interval for each class, i.e., the space within which 95 % of the spectra of the respective class are located. Since the ellipsoids of the two *E. coli* strains are in part intersecting, a distinction between the two strains will be difficult. The assignment of the spectra to one of the four classes is given in Electronic supplementary material, Table S2A, visualization of the separating LD vectors can be found in the Electronic supplementary material, Fig. S1.

To identify untreated bacteria from the left out replicate with model N, the independent data are projected into the same space as the model training data (see Fig. 3a). The assignment results are summarized in Electronic supplementary material, Table S2B. From the data, we calculated that 79.8 % of the spectra (415 out of 520) are assigned to the correct strain. The low accuracy on strain level indicates that the distinction between the different *E. coli* strains is not very effective with our model. Combining both strains of *E. coli* to one class allows us to determine the model's capability to correctly determine the bacterial species. Identification of the different species is achieved with very high accuracy of almost 96 % (498 out of 520). Further combination of the species to classes of the same genus (*Escherichia* versus *Pseudomonas*) results in correct class assignment for 98.7 % of the spectra (513/520).

Since the performance of the model for the species identification of new data is the same as for classification (see Electronic supplementary material, Tables S2A and S2B), the model generalizes very well. Only for the two strains of *E. coli*

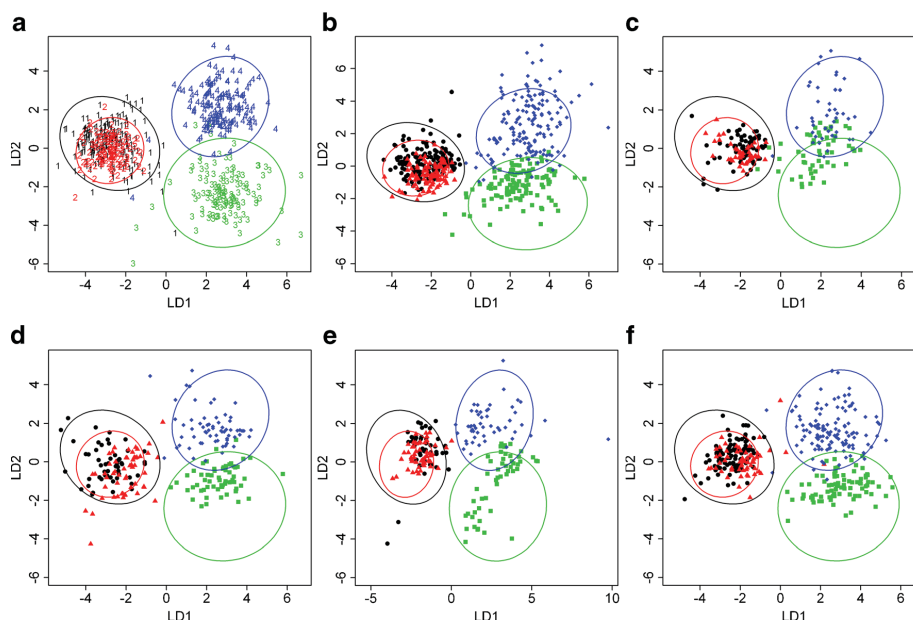


Fig. 3 Classification and identification results for the LDA model trained with untreated bacteria (model N). Panel **a** displays the classification results. The *numbers* represent the single spectra from the training data set, the *ellipses* represent the area, within which 95 % of the spectra per class are located. Panels **b** to **f** show the position of the identification data (*symbols*) in relation to the classification data (*ellipses*) for native bacteria

(**b**) and bacteria treated with ampicillin (**c**), ciprofloxacin (**d**), gentamicin (**e**) and sulfamethoxazole (**f**). The colors correspond to *E. coli* DSM 423 (black), *E. coli* DSM 498 (red), *P. stutzeri* (green) and *P. thermotolerans* (blue). Note that the axes are chosen differently in each panel in order to display all data points of the identification spectra

there seems to be a tendency to overfit the classification data, as the strains can be separated reasonably well in the latter but this separation capability is lost for the independent data. Therefore, the distinction of the two strains will rarely be discussed further. It should be noted, however, that this lack of strain distinction capability is not inherent to the method of Raman spectroscopic identification, since other researchers successfully discriminate up to nine different *E. coli* strains [24, 25].

Influence of antibiotics on identification performance Model N is then used to identify antibiotically treated bacteria. The results are displayed in Fig. 3c-f and summarized in the confusion tables S2C-E (Electronic supplementary material). An exemplary summary of the spectral assignment to one of the four classes is given in Table 1 for ciprofloxacin-treated bacteria.

In Fig. 3, the data points from the model training (Fig. 3a) are omitted for better orientation and only the elliptical confidence areas are depicted.

For bacteria grown with ciprofloxacin or sulfamethoxazole (Fig. 3d, f), the new data clearly localize within the elliptical confidence interval, indicating accurate identification. Correct species assignment is obtained for 95.3 and 97.3 % of the bacteria, respectively (Table 1 and Electronic supplementary

material, Table S2E). Spectra of ampicillin- or gentamicin-treated bacteria (Fig. 3c, e) are visibly more dissimilar to the training data, their data points being shifted towards the edges of the ellipses and correct species identification is obtained only for 85.4 % of the ampicillin-treated and 89.9 % of the gentamicin-treated bacteria (Electronic supplementary material, Tables S2C and S2D). One may expect the spectral variations induced by the antibiotic treatment to be reflected in the mean spectra. However, no consistent spectral variation is visible by eye upon comparing the mean spectra of treated and untreated bacteria (see Electronic supplementary material, Fig. S2a). Spectral regions that differ between treated and untreated bacteria coincide with regions of large spectral variation within a class (see Electronic supplementary material, Fig. S2b), which renders these variations most likely nonsignificant [29].

As a generalization test of model N, we introduced strains unknown to the database. One is the strain *E. coli* DH5 α , which additionally displays resistance against ampicillin. Although not being included into the training data and always grown with ampicillin, most of the spectra are localized within the confidence intervals of the *E. coli* classes of the training set and 98.4 % of the spectra are identified correctly to be *E. coli* (see Electronic supplementary material, Fig. S3a and

3046

U. Münchberg et al.

Table 1 Confusion tables of LDA identification of ciprofloxacin-treated bacteria with model N

The first part presents the results on strain level, the second part gives the same results on species level, i.e., both strains of *E. coli* are combined to one class. Sensitivity and specificity are given for each class. For strain distinction, the overall sensitivity is 77.0 % and overall specificity is 92.8 %. For species identification, average sensitivity is 94.3 % and average specificity is 97.7 %

Assigned to	Real class			
Strain level	<i>E. coli</i> DSM 423	<i>E. coli</i> DSM 498	<i>P. stutzeri</i>	<i>P. thermotolerans</i>
<i>E. coli</i> DSM 423	40	28	0	1
<i>E. coli</i> DSM 498	12	26	0	1
<i>P. stutzeri</i>	0	0	53	0
<i>P. thermotolerans</i>	0	1	8	62
Total accuracy	78.0 %			
Sensitivity	76.9 %	47.3 %	86.9 %	96.9 %
Specificity	83.9 %	92.7 %	100 %	94.6 %
Species level	<i>E. coli</i>	<i>P. stutzeri</i>	<i>P. thermotolerans</i>	
<i>E. coli</i>	106	0	2	
<i>P. stutzeri</i>	0	53	0	
<i>P. thermotolerans</i>	1	8	62	
Total accuracy	95.3 %			
Sensitivity	99.1 %	86.9 %	96.9 %	
Specificity	98.4 %	100 %	94.6 %	

Table S3). Going a step further, we challenged the model with a patient isolate of *P. aeruginosa*, which also was treated with antibiotics. In the LDA score plot, these spectra are localized close to the *Pseudomonas* species used for model training, but the center of the group is visibly different, being between both known *Pseudomonas* species (see Electronic supplementary material, Fig. S3c–d). This is to be expected as this species was not included into the training data. Still, up to 98 % of the bacteria were assigned to the correct genus (see Electronic supplementary material, Table S4). Furthermore, the treatment with different antibiotics does not lead to major shifts of the spectroscopic data in the LDA space (see Electronic supplementary material, Fig. S3c–d). This indicates that from a spectroscopic point of view, pathogenic bacteria react to antibiotic treatment in the same way as non-pathogenic ones.

To investigate dosage effects, we grew samples with increased antibiotic concentrations. For two samples cultivated with doubled gentamicin dose species identification was still correct for all spectra of *E. coli* DSM 498 and for 85.7 % of the spectra from *P. stutzeri* (see Electronic supplementary material, Fig. S3b and Table S3). For *E. coli* DH5 α , increasing the ampicillin concentration to 5 or 20 mg/L does not change the identification performance. All spectra but one were correctly identified as *E. coli* (see Electronic supplementary material, Fig. S3a and Table S3).

Inclusion of antibiotic stress into model training The spectral changes in the bacteria upon antibiotic treatment may be due to the nature of the particular antibiotic or they can be a result of the stress the bacteria experience by the application of antibiotics. To investigate this question, we created a new LDA model, where we used native bacteria and bacteria stressed with ciprofloxacin for the training (model NC) thus

reflecting general antibiotic stress in the database. Upon projection of independent data from identically treated bacteria into the LD space of the training data (Electronic supplementary material, Fig. S4b and S4d) most of the new data cluster in the same space as the training data. Correct species identification is achieved for 97.3 % of the native and 97.4 % of the ciprofloxacin-treated bacteria (Electronic supplementary material, Tables S5B and 2), which represents a slight improvement compared to model N by 1.5 and 2.3 %, respectively.

This improvement in identification, however, is also observed for the antibiotics not included into the training of the model. Identification accuracy of bacteria treated with ampicillin, gentamicin, and sulfamethoxazole is improved by 2.0, 1.9, and 0.6 %, respectively (Electronic supplementary material, Tables S5C–E).

The comparison of the assignment of ciprofloxacin-treated bacteria with Table 1 shows that the strain identification for spectra of *E. coli* significantly improves from 69.0 % with model N to 86.9 % with model NC. Also, for bacteria treated with other antibiotics, strain identification is improved.

To test whether the mode of action of the antibiotics induces specific spectral changes in the bacteria, we trained two models exclusively with data from ampicillin- and ciprofloxacin-treated bacteria (model A and model C), respectively. These models should perform superior on unknown data treated with the same antibiotic. For species identification of independent test data, both models perform similarly well on respectively treated samples as model N (see Electronic supplementary material, Fig. S5 and Table S6 for model A and Fig. S6 and Table S7 for model C), but for strain identification the best performance on spectra from antibiotically treated bacteria is indeed achieved with the model trained with the respective antibiotic.

Table 2 Confusion tables of LDA identification of ciprofloxacin-treated bacteria with model NC

The first part presents the results on strain level, the second part gives the same results on species level, i.e., both strains of *E. coli* are combined to one class. Sensitivity and specificity are given for each class. For strain distinction, the overall sensitivity is 91.6 % and overall specificity is 97.3 %. For species identification, average sensitivity is 97.0 % and average specificity is 98.7 %

Assigned to	Real class			
Strain level	<i>E. coli</i> DSM 423	<i>E. coli</i> DSM 498	<i>P. stutzeri</i>	<i>P. thermotolerans</i>
<i>E. coli</i> DSM 423	51	12	0	1
<i>E. coli</i> DSM 498	1	42	0	1
<i>P. stutzeri</i>	0	0	59	1
<i>P. thermotolerans</i>	0	1	2	61
Total accuracy	91.8 %			
Sensitivity	98.1 %	76.4 %	96.7 %	95.3 %
Specificity	92.8 %	98.9 %	99.4 %	98.2 %
Species level	<i>E. coli</i>	<i>P. stutzeri</i>	<i>P. thermotolerans</i>	
<i>E. coli</i>	106	0	2	
<i>P. stutzeri</i>	0	59	1	
<i>P. thermotolerans</i>	1	2	61	
Total accuracy	97.4 %			
Sensitivity	99.1 %	96.7 %	95.3 %	
Specificity	98.4 %	99.4 %	98.2 %	

A comparison of the discriminating spectral features reveals that irrespective of the applied antibiotic, the same spectral features are important for genus and species distinction. For a detailed discussion, see supporting information and Electronic supplementary material, Fig. S1.

Discussion

In our study, we investigate the impact of antibiotic treatment of bacteria on the performance of an LDA model to correctly identify these bacteria based on their Raman spectra. Since Raman spectroscopic identification works with pathogenic and apathogenic bacteria alike, for work safety reasons we chose non-pathogenic bacteria in our study to evaluate the antibiotic impact. As target organisms, we chose non-pathogenic representatives of frequent Gram-negative sepsis-causing bacteria. Two *Pseudomonas* species substitute for *P. aeruginosa* and two *E. coli* strains substitute for pathogenic *E. coli* strains. The different levels of relation are included to estimate the discriminatory power of our method on genus, species, and strain level, respectively. Although all samples were supplied with full medium, some were subjected to antibiotic stress. As later on in clinical settings it is very likely that samples of patients that have already received antibiotic therapy contain ineffectively treated bacteria, we treated our bacteria inefficiently in this study as well by applying subinhibitory concentrations of the antibiotics. To account for the different modes of action of antibiotics, we chose four antibiotic representatives with common modes of action for this study: Ampicillin as β -lactam antibiotic inhibits cell wall growth, ciprofloxacin as a member of the fluoroquinolones is an inhibitor of DNA replication, gentamicin prevents the

translation of the mRNA and therefore the protein biosynthesis and sulfamethoxazole inhibits the synthesis of folic acid, a precursor to the coenzyme tetrahydrofolate which is essential for DNA replication.

Identification of bacteria with model N For a first LDA model, only spectra of bacteria grown without antibiotics are used for training (model N). Prediction accuracy with leave-one-out cross-validation is good with 92.8, 97.5, and 98.7 % for correct strain, species and genus assignment, respectively (see Electronic supplementary material, Table S2A). For an independent data set, correct identification was achieved only for 79.8 % of the data. This reduced performance on identification data is mostly due to intra-species misclassification of the *E. coli* strains. This indicates that the model is not well suited to distinguish between the two closely related *E. coli* strains but is rather overfitted in this respect. Most likely, a separate model trained to distinguish solely stains of *E. coli* will be needed, if identification is required on strain level [24, 25]. Still, species identification is successful for 95.8 % of the spectra (see Electronic supplementary material, Table S2B), showing the general applicability of our model to identify the different Gram-negative bacteria used in our study.

Although previous reports suggest changes of the Raman spectra by antibiotic treatment [26, 34–37] most were done at concentrations several times higher than the MIC [26, 35–37]. For clinical samples, this would correspond to effective microbial treatment in a patient. By contrast, our experiments were done with subinhibitory concentrations of antibiotics, which for clinical samples would correspond to ineffective treatment caused by too low dosage or resistance of the pathogen against the respective antibiotic. We find that accurate species prediction for treated bacteria is possible for up to

97.3 % of the spectra, but differs between the four antibiotics investigated in this study. Ciprofloxacin and sulfamethoxazole are found to be less disruptive for the identification procedure than ampicillin or gentamicin. This may be due to their different modes of action.

Ciprofloxacin and sulfamethoxazole impair the DNA replication either directly or indirectly. These antibiotics therefore slow the natural bacterial cell cycle and change the amount of DNA, but this amount varies throughout the normal cell division as well. These variations will therefore be represented in the training data set by untreated bacteria in different stages of DNA replication. As a consequence, bacteria treated with ciprofloxacin or sulfamethoxazole are identified with high accuracies of 95.3 and 97.3 %, respectively (Table 1 and Electronic supplementary material, Table S2E).

On the other hand, antibiotics such as ampicillin and gentamicin change the composition of the cells by interfering with the biosynthesis of the cell wall or proteins. These biochemical deviations will also be reflected in their Raman spectra, but will not be captured by the natural variations in the training data of native bacteria and can therefore lead to difficulties during identification. This is reflected by the reduced performance of the LDA model in identifying ampicillin- or gentamicin-treated bacteria, achieving 85.4 and 89.9 % accurate species identification only (Electronic supplementary material, Tables S2C and S2D).

Interestingly, the concentration of the antibiotics seems to have no effect on the identification performance as long as it is subinhibitory. Doubling the gentamicin concentration for a sample of *E. coli* DSM 498 and *P. stutzeri* or growing the ampicillin-resistant *E. coli* strain with increasing concentrations of ampicillin up to 40× the original concentration caused no difficulties for species identification (Electronic supplementary material, Table S3).

The correct identification of the new strain of *E. coli* DH5 α indicates that the model can be used to identify the species of strains not included into the model. Furthermore, the fact that this particular strain shows an antibiotic resistance pattern and still can be identified accurately is a hint that leads us to believe that our method is applicable for the identification of both susceptible and resistant bacteria. This will have to be validated of course with susceptible and resistant strains of other species. The investigation of pathogenic *P. aeruginosa* treated with antibiotics shows that spectroscopically their reaction is comparable to that of non-pathogenic bacteria. This indicates that our findings can be transferred to pathogenic bacteria. Our results suggest that bacteria grown under subinhibitory concentrations of an antibiotic can be identified by their Raman spectra even if the identification model is derived from untreated bacteria only.

Inclusion of antibiotic stress into database The expansion of the training data with spectra of antibiotically treated bacteria

of the same type results in enhanced identification accuracy for independent test spectra of antibiotically treated bacteria. The improvement is also observed for antibiotics that have not been included in the model training. Therefore, we conclude that the representation of unspecific antibiotic stress in the reference database is beneficial for species identification of new samples treated with different antibiotics. It can also improve the discriminatory power for closely related groups like different strains of a species, but the magnitude of the effect varies depending on the antibiotic.

If an antibiotic induces specific biochemical changes in the cells, a model trained exclusively with bacteria treated with this antibiotic should perform superior in identification of unknown samples treated with the same antibiotic. However, for species identification, we found no such correlation for model A (ampicillin-treated bacteria) or model C (ciprofloxacin-treated bacteria). This indicates that changes induced by the subinhibitory application of the antibiotics do not overshadow the spectral variations between different species and Raman spectroscopic species identification is still applicable.

However, the strain distinction is influenced by the representation of antibiotic treatment in the LDA models. A model distinguishes the two *E. coli* strains most successfully if new samples were cultivated under the same conditions as the database, i.e., model N identifies untreated bacteria best, model A ampicillin-treated, and model C ciprofloxacin-treated ones. Hence, the antibiotics' different modes of action seem to induce different biochemical changes in the bacteria and correspondingly in their Raman spectra, which are in a similar order of magnitude as the variations between strains. Therefore, accounting for antibiotic stress in general in the LDA model may improve strain distinction to some degree, but a representation of the specific applied antibiotic in the training database is most effective in improving identification correctness for closely related groups.

Conclusions

From our results, we conclude that bacteria treated with various antibiotics can be successfully identified by Raman spectroscopy. In the model, it is not necessary to account for each available drug, rather a limited selection to represent antibiotic stress in general seems to be sufficient. The differentiation between strains is a more challenging task and requires the applied model to be more tailored to the specific task by representing the specific antibiotic in the model database only. It remains to be investigated, whether such a specific model will have to be set up for each antibiotic or simply for different groups of antibiotics reflecting their modes of action. For future application, the database will have to be expanded to include clinically relevant Gram-positive and Gram-negative

pathogens. Also, the effect of different resistance mechanisms on the spectral identification performance will have to be evaluated.

Acknowledgments U. M. highly acknowledges Dr. Eike T. Spielberg for helpful discussions on statistical problems. Thanks to Bernd Kampe for assistance with GNU R, Sophie Friedrich and the Seminarfach group “Sepsis” are acknowledged for the acquisition of parts of the spectral data. Financial support from Jena School for Microbial Communication (DFG) and funding of the research group “Jenaer Biochip Initiative 2.0” within the framework “Unternehmen Region—InnoProfile Transfer” from the Federal Ministry of Education and Research, Germany (BMBF) is gratefully acknowledged.

References

- Levy SB (2005) Antibiotic resistance—the problem intensifies. *Adv Drug Delivery Rev* 57(10):1446–1450. doi:10.1016/j.addr.2005.04.001
- Hranjec T, Rosenberger LH, Swenson B, Metzger R, Flohr TR, Politano AD, Riccio LM, Popovsky KA, Sawyer RG (2012) Aggressive versus conservative initiation of antimicrobial treatment in critically ill surgical patients with suspected intensive-care-unit-acquired infection: a quasi-experimental, before and after observational cohort study. *Lancet Infect Dis* 12 (10):774–780. doi:10.1016/S1473-3099(12)70151-2
- Paul M, Kariv G, Goldberg E, Raskin M, Shaked H, Hazzan R, Samra Z, Paghis D, Bishara J, Leibovici L (2010) Importance of appropriate empirical antibiotic therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *J Antimicrob Chemother* 65(12):2658–2665. doi:10.1093/jac/dkq373
- Retamar P, Portillo MM, López Prieto MD, Rodríguez López F, De Cueto M, García MV, Gómez MJ, Del Arco A, Muñoz A, Sánchez Porto A, Torres Tortosa M, Martín Aspás A, Arroyo A, García Figueras CAF, Corzo JE, León Ruiz L, Escobar Lara T, Rodríguez Bano J, Group SSB (2012) Impact of inadequate empirical therapy on the mortality of patients with bloodstream infections: a propensity score-based analysis. *Antimicrob Agents Chemother* 56(1):472–478. doi:10.1128/aac.00462-11
- Bloos F, Sachse S, Kortgen A, Pletz MW, Lehmann M, Straube E, Riedemann NC, Reinhart K, Bauer M (2012) Evaluation of a polymerase chain reaction assay for pathogen detection in septic patients under routine condition: an observational study. *PLoS ONE* 7(9):e46003. doi:10.1371/journal.pone.0046003
- Buchan BW, Riebe KM, Ledebor NA (2012) Comparison of the MALDI Biotyper system using Sepsityper specimen processing to routine microbiological methods for identification of bacteria from positive blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 50(2):346–352. doi:10.1128/jcm.05021-11
- Fykse EM, Langseth B, Olsen JS, Skogan G, Blatny JM (2008) Detection of bioterror agents in air samples using real-time PCR. *J Appl Microbiol* 105(2):351–358. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03750.x
- Ottesen EA, Hong JW, Quake SR, Leadbetter JR (2006) Microfluidic digital PCR enables multigene analysis of individual environmental bacteria. *Science* 314(5804):1464–1467. doi:10.1126/science.1131370
- Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet TM, Girard M, Francois P, Schrenzel J (2010) Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine bacterial speciation. *J Clin Microbiol* 48(4):1169–1175. doi:10.1128/jcm.01881-09
- Croxatto A, Prod'homme G, Greub G (2012) Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev* 36(2):380–407. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x
- Wieser A, Schneider L, Jung J, Schubert S (2012) MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl Microbiol Biotechnol* 93(3):965–974. doi:10.1007/s00253-011-3783-4
- Anderson NW, Buchan BW, Riebe KM, Parsons LN, Gnacinski S, Ledebor NA (2012) Effects of solid-medium type on routine identification of bacterial isolates by use of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 50(3):1008–1013. doi:10.1128/jcm.05209-11
- March-Rosselló GA, Muñoz-Moreno MF, García-Loygorri-Jordán de Urriés MC, Bratos-Pérez MA (2012) A differential centrifugation protocol and validation criterion for enhancing mass spectrometry (MALDI-TOF) results in microbial identification using blood culture growth bottles. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 32(5):699–704. doi:10.1007/s10096-012-1797-1
- Szabados F, Michels M, Kaase M, Gatermann S (2011) The sensitivity of direct identification from positive BacT/ALERT™ (bioMérieux) blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry is low. *Clin Microbiol Infect* 17(2):192–195. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03229.x
- Juiz PM, Almela M, Melción C, Campo L, Esteban C, Pitart C, Marco F, Vila J (2012) A comparative study of two different methods of sample preparation for positive blood cultures for the rapid identification of bacteria using MALDI-TOF MS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31(7):1353–1358. doi:10.1007/s10096-011-1449-x
- Beekes M, Lasch P, Naumann D (2007) Analytical applications of Fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopy in microbiology and prion research. *Vet Microbiol* 123 (4):305–319. doi:10.1016/j.vetmic.2007.04.010
- Bosch A, Miñán A, Vescina C, Degrossi J, Gatti B, Montanaro P, Messina M, Franco M, Vay C, Schmitt J, Naumann D, Yantom O (2008) Fourier transform infrared spectroscopy for rapid identification of nonfermenting gram-negative bacteria isolated from sputum samples from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 46(8):2535–2546. doi:10.1128/jcm.02267-07
- Harz M, Rösch P, Popp J (2009) Vibrational spectroscopy—a powerful tool for the rapid identification of microbial cells at the single-cell level. *Cytometry Part A* 75A(2):104–113. doi:10.1002/cyto.a.20682
- Wenning M, Büchl NR, Scherer S (2010) Species and strain identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and artificial neural networks. *J Biophotonics* 3(8–9):493–505. doi:10.1002/jbio.201000015
- Harz M, Kiehntopf M, Stöckel S, Rösch P, Straube E, Deufel T, Popp J (2009) Direct analysis of clinically relevant single bacterial cells from cerebrospinal fluid during bacterial meningitis by means of micro-Raman spectroscopy. *J Biophotonics* 2(1–2):70–80. doi:10.1002/jbio.200810068
- Hutsebaut D, Maquelin K, De Vos P, Vandenebeele P, Moens L, Puppels GJ (2004) Effect of culture conditions on the achievable taxonomic resolution of Raman spectroscopy disclosed by three *Bacillus* species. *Anal Chem* 76(21):6274–6281. doi:10.1021/ac0492281
- Kastanos EK, Kyriakides A, Hadjigeorgiou K, Pitris C (2009) A novel method for urinary tract infection diagnosis and antibiogram using Raman spectroscopy. *J Raman Spectrosc* 41(9):958–963. doi:10.1002/jrs.2540
- Kloß S, Kampe B, Sachse S, Roesch P, Straube E, Pfister W, Kiehntopf M, Popp J (2013) Culture independent Raman spectroscopic identification of urinary tract infection pathogens—a proof of principle study. *Anal Chem* 85(20):9610–9616. doi:10.1021/ac401806f

24. Hamasha K, Mohaidat QI, Putnam RA, Woodman RC, Palchaudhuri S, Rehse SJ (2013) Sensitive and specific discrimination of pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* using Raman spectroscopy—a comparison of two multivariate analysis techniques. *Biomed Opt Express* 4(4):481–489. doi:10.1364/BOE.4.000481
25. Walter A, März A, Schumacher W, Rösch P, Popp J (2011) Towards a fast, high specific and reliable discrimination of bacteria on strain level by means of SERS in a microfluidic device. *Lab Chip* 11(6):1013–1021. doi:10.1039/C0LC00536C
26. Moritz TJ, Taylor DS, Polage CR, Krol DM, Lane SM, Chan JW (2010) Effect of cefazolin treatment on the nonresonant raman signatures of the metabolic state of individual *Escherichia coli* cells. *Anal Chem* 82(7):2703–2710. doi:10.1021/ac902351a
27. Xie C, Mace J, Dimmo MA, Li YQ, Tang W, Newton RJ, Gemperline PJ (2005) Identification of single bacterial cells in aqueous solution using confocal laser tweezers Raman spectroscopy. *Anal Chem* 77(14):4390–4397. doi:10.1021/ac0504971
28. Hemelink A, Brauer A, Lasch P, Naumann D (2009) Phenotypic heterogeneity within microbial populations at the single-cell level investigated by confocal Raman microspectroscopy. *Analyst* 134:1149–1153. doi:10.1039/b822574e
29. Meisel S, Stöckel S, Rösch P, Popp J (2013) Identification of meat-associated pathogens via Raman microspectroscopy. *Food Microbiol.* doi:10.1016/j.fm.2013.08.007
30. Stöckel S, Meisel S, Elschner M, Rösch P, Popp J (2012) Raman spectroscopic detection of anthrax endospores in powder samples. *Angew Chem Int Ed* 51(22):5339–5342. doi:10.1002/anie.201201266
31. Walter A, Reinicke M, Bocklitz T, Schumacher W, Rösch P, Kothe E, Popp J (2011) Raman spectroscopic detection of physiology changes in plasmid-bearing *Escherichia coli* with and without antibiotic treatment. *Anal Bioanal Chem* 400(9):2763–2773. doi:10.1007/s00216-011-4819-4
32. Shafazand S, Weinacker AB (2002) Blood cultures in the critical care unit—improving utilization and yield. *Chest* 122(5):1727–1736. doi:10.1378/chest.122.5.1727
33. Flayhart D, Borek AP, Wakefield T, Dick J, Carroll KC (2007) Comparison of BACTEC PLUS blood culture media to BacT/Alert FA blood culture media for detection of bacterial pathogens in samples containing therapeutic levels of antibiotics. *J Clin Microbiol* 45(3):816–821. doi:10.1128/jcm.02064-06
34. Lopez Diez EC, Winder CL, Ashton L, Currie F, Goodacre R (2005) Monitoring the mode of action of antibiotics using Raman spectroscopy: investigating subinhibitory effects of amikacin on *Pseudomonas aeruginosa*. *Anal Chem* 77(9):2901–2906. doi:10.1021/ac048147m
35. Neugebauer U, Schmid U, Baumann K, Holzgrave U, Ziebuhr W, Kozitskaya S, Kiefer W, Schmitt M, Popp J (2006) Characterization of bacterial growth and the influence of antibiotics by means of UV resonance Raman spectroscopy. *Biopolymers* 82(4):306–311. doi:10.1002/bip.20447
36. Moritz TJ, Polage CR, Taylor DS, Krol DM, Lane SM, Chan JW (2010) Evaluation of *Escherichia coli* cell response to antibiotic treatment using laser tweezers Raman spectroscopy. *J Clin Microbiol* 48(11):4287–4290. doi:10.1128/jcm.01565-10
37. Escoriza MF, VanBriesen JM, Stewart S, Maier J (2007) Raman spectroscopic discrimination of cell response to chemical and physical inactivation. *Appl Spectrosc* 61(8):812–823. doi:10.1366/000370207781540132
38. R core team (2012) R: A Language and Environment for Statistical Computing, 2111th edn. R Foundation for Statistical Computing, Vienna
39. Carrabba MM (2002) Wavenumber standards for Raman spectroscopy. In: *Handbook of vibrational spectroscopy*. Wiley. doi:10.1002/0470027320.s0705

Analytical and Bioanalytical Chemistry

Electronic Supplementary Material

Raman-spectroscopic identification of single bacterial cells under antibiotic influence

Ute Münchberg, Petra Rösch, Michael Bauer, Jürgen Popp

Materials and Methods

MIC determination

The MIC for each antibiotic was determined with dilution series. For these experiments a bacterial overnight culture was diluted 1:100 with NA and incubated at 37°C for approximately 3 to 4 hours to an optical density (OD) of 0.5, which corresponds to approximately 10^8 cells/mL. This culture being in the exponential growth phase was further diluted 1:200 with NA to obtain a suspension of 10^5 - 10^6 cells/mL. One millilitre of this bacterial suspension was added to one millilitre of various concentrated antibiotic solutions in NA. The test tubes were incubated at 37°C for 18 hours and positive growth was determined by visible evaluation of turbidity. The MIC of the least tolerant microorganism was selected and half its concentration used for cultivation of all bacteria for Raman spectroscopic measurements. Final concentrations of antibiotics in the culture broth of measured bacteria were 0.5 mg/L for ampicillin, 0.0025 mg/L for ciprofloxacin, 0.25 mg/L for gentamicin and 4 mg/L for sulfamethoxazole.

Results and Discussion

To ascertain which spectral features that are responsible for the discrimination between the four bacterial groups are possibly altered by antibiotic treatment we compared the loadings of the LDA models with each other. In figure S1 the respective loading vectors of all three LDA models (N, A and C) are superimposed in the fingerprint region (1800-650 cm^{-1}).

LD1, which mainly distinguishes between the genera of *Escherichia* and *Pseudomonas*, is very similar in all three models. For LD2, which mostly differentiates between both *Pseudomonas* species, slightly more dissimilarities are apparent. In the loadings of LD3, which discriminates between the two strains of *E. coli*, only the general patterns resemble each other, but numerous deviations occur at various regions of the spectra.

This comparison of the separating spectral features shows that the same spectral features are important for genus and species distinction, even if the bacteria have been treated with antibiotics that act on different parts of the cell. This indicates, that any changes in the biochemical composition of the bacteria and therefore in their Raman spectroscopic fingerprint, that is induced by the subinhibitory application of the antibiotics, is small in comparison to the spectral variations between different species.

The distinction between different strains is more subjected to the actual treatment of the bacteria. LD3, which is mainly responsible for the distinction between the two *E. coli* strains, of model N, A and C with each other, the vector is only similar in shape for the different models but considerable deviations are observed upon variation of the antimicrobial treatment (see figure S1).

Changes in spectral features could not be assigned to unspecific or specific antibiotic stress.

Table S1. Assignment of the major Raman bands for the bacterial spectra according to literature

Band position [cm ⁻¹]	position according to reference [cm ⁻¹]	Assignment according to literature	source
3062	3060	v(CH) olefinic	[1]
	3059	v(C=C-H) _{aromatic}	[2]
2933	2939	v(CH ₂ /CH ₃) proteins	[3]
	2935	v(CH ₂) asymmetric	[1]
	2935	v(CH ₂)	[4]
	2935	v(CH ₃) and v(CH ₂)	[2]
	2933 / 2935	v(CH ₂)/v(CH ₃)	[5]
2845	2817-2849	v _{sym} (CH ₂) of lipids	[5]
	2840-2875	v _{sym} (CH ₃) of lipids	[5]
1730	1749	v(C=O)	[4]
	1746	v(C=O) ester	[6]
	1736	v(C=O) ester	[7]
	1735	v(C=O) ester	[2]
	1729-1740	v(C=O) ester group (lipids)	[5]
1659	1650 – 1680 (1660)	Amide I	[2]
	1665	Amide I	[6]
	1663	Amide I	[4]
	1660	Amide I	[8]
	1660	Amide I	[7]
	1659	Amide I	[5]
	1655	Amide I	[3]
	1650 - 1680	Amide I	[1]
1585	1587	cytochrome <i>c</i>	[9]
	1583	cytochrome <i>c</i>	[10]
	1582	nucleic acid bases	[6]
1578	1578	A, G ring stretching modes	[4]
	1578	A/G ring stretching	[11]
	1578	G, A	[7]
	1576	nucleic acid modes (G, pyrimidine)	[5]
	1575	G, A ring stretching	[1]
	1575	G, A ring stretching	[2]
	1575	G, A ring mode DNA/RNA	[8]
	1574	v(ring) G, A DNA, cytochrome	[3]
1480	1485	A/G ring stretching/ planar vibrations	[11]
	1477	U	[8]
	1475	G, A (244)	[12]
1447	1452	CH deformation, CH ₂ bending	[8]
	1450	C-H deformation modes	[4]
	1449	C-H vibrations	[7]
	1445 - 1450	CH ₂ and CH ₃ deformation	[5]
	1445	γ(CH)	[3]
	1440 - 1460	Δ(CH ₂) scissoring from CH bindings in lipids, proteins and carbohydrates	[1]
	1440 - 1460	δ(CH ₂)	[2]
	1440	CH ₂ and CH ₃ deformations	[6]
1337	1338	AMP, GMP	[4]
	1336	A/G/U	[11]
	1335	CH ₃ and CH ₂ wagging mode	[5]
	1334	δ(CH)	[3]
	1327	δ(C-H)	[1]
1317	1324	A, G (244)	[12]

Band position [cm ⁻¹]	position according to reference [cm ⁻¹]	Assignment according to literature	source	
1243	1316	A/G ring stretching	[11]	
	1314	cytochrome <i>c</i>	[9]	
	1311	cytochrome <i>c</i>	[10]	
	1250	Amide III	[4]	
	1245	Amide III	[8]	
	1242-1247	Amide III	[5]	
	1238	Amide III	[3]	
	1230-1295 (1250)	Amide III	[2]	
	1200-1280	Amide III	[1]	
	1200-1300	Amide III	[7]	
1125	1130	cytochrome <i>c</i>	[9]	
	1129	v(C-N) and v (C-C)	[2]	
	1128	cytochrome <i>c</i>	[10]	
	1126	v(C-N), v(C-C) protein	[8]	
	1125	v(C-N), v(C-C)	[1]	
	1123-1127	v(C-C), v(C-N)	[5]	
	1094	1102	v (>PO ₂) _{sym}	[2]
1100		O-P-O ⁻ symm. stretch DNA/ RNA	[8]	
1098		PO ₂ ⁻ symmetric stretching	[11]	
1098		C-C skeletal	[2]	
1098		v(COC) from glycosidic link	[2]	
1095		PO ₂ ⁻ phosphate sugar backbone	[7]	
1060-1095		v(C-C) of chains	[7]	
1003		1005	Phe	[7]
		1004	phe	[2]
		1003	Phe	[8]
	1002-1006	Phe symmetric ring breathing mode	[5]	
	1001	v(CC) aromatic ring breathing phenylalanine	[1]	
	1001	symmetric benzene/pyrrole in-phase and out of phase breathing mode of tryptophan and phenylalanine	[4]	
	1001	Phe, Trp proteins	[3]	
810	1000	Phe ring breathing	[6]	
	813	C ₅ '-O-P-O-C ₃ ' phosphodiester bonds in RNA	[7]	
	813	O-P-O symmetric stretching (marker for A-form helix)	[11]	
785	812	DNA, RNA O-P-O stretching	[8]	
	788	C ₅ '-O-P-O-C ₃ ' phosphodiester bonds in DNA	[7]	
	787	C/U breathing/stretching	[11]	
	785	C, U ring stretching	[2]	
	785	U, T, C ring breathing modes DNA/RNA backbone O-P-O of DNA	[5]	
	784	C,T, U ring breathing DNA/RNA	[8]	
		O-P-O ⁻ DNA		
	782	T, C, U	[7]	
	781	U, C ring breathing (UMP, CMP)	[4]	
	779	C, U DNA/RNA	[3]	
749	778	C, U ring stretching	[1]	
	750	cytochrome <i>c</i>	[10]	
	750	cytochrome <i>c</i>	[9]	

Abbreviations: v stretching mode, δ/γ deformation mode, A adenine, AMP adenine monophosphate C cytosine, G guanine, GMP guanine monophosphate, Phe phenylalanine, T thymine, Trp tryptophane, U uracil,

Tables S2. A-E Classification and identification performance of the LDA model trained with native bacteria (model N). Table S2A shows the classification results. Tables S2B-F show the identification results for bacteria grown without antibiotics (B), with ampicillin (C), gentamicin (D) and sulfamethoxazole (E). Identification results for ciprofloxacin-treated bacteria are shown in table 1 in the main text

S2. A Classification of bacteria without treatment with model N

real class assigned to	<i>E. coli</i> DSM 423	<i>E. coli</i> DSM 498	<i>E. coli</i>	<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292
<i>E. coli</i> DSM 423	185	14	323	2	2
<i>E. coli</i> DSM 498	15	109		1	0
<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	2	0	2	118	2
<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292	0	1	1	5	155
total accuracy [%]	92.8		97.5		
sensitivity [%]	91.6	87.9	99.1	93.7	97.5
specificity [%]	95.6	96.7	95.6	99.2	98.7

S2. B Identification of bacteria without antibiotic treatment with model N

real class identified as	<i>E. coli</i> DSM 423	<i>E. coli</i> DSM 498	<i>E. coli</i>	<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292
<i>E. coli</i> DSM 423	113	54	239	5	2
<i>E. coli</i> DSM 498	29	43		0	0
<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	0	0	0	104	4
<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292	0	0	0	11	155
total accuracy [%]	79.8		95.8		
sensitivity [%]	79.6	44.3	100	86.7	96.3
specificity [%]	83.9	93.1	97.5	99.3	96.9

S2. C Identification of bacteria treated with ampicillin with model N

real class identified as	<i>E. coli</i> DSM 423	<i>E. coli</i> DSM 498	<i>E. coli</i>	<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292
<i>E. coli</i> DSM 423	41	15	115	4	0
<i>E. coli</i> DSM 498	29	30		1	1
<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	0	0	0	23	1
<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292	0	0	0	24	43
total accuracy [%]	64.6		85.4		
sensitivity [%]	58.6	66.7	100	44.2	95.6
specificity [%]	86.6	81.4	93.8	99.4	85.6

The confusion table for ciprofloxacin-treated bacteria is given in the main text as table 1.

S2. D Identification of bacteria treated with gentamicin with model N

real class identified as	<i>E. coli</i> DSM 423	<i>E. coli</i> DSM 498	<i>E. coli</i>	<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292
<i>E. coli</i> DSM 423	27	29	102	0	0
<i>E. coli</i> DSM 498	19	27		0	0
<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	0	0	0	31	0
<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292	0	0	0	21	53
total accuracy [%]	66.7		89.9		
sensitivity [%]	58.7	48.2	100	59.6	100
specificity [%]	82.0	87.4	100	100	86.4

S2. E Identification of bacteria treated with sulfamethoxazole with model N

real class identified as	<i>E. coli</i> DSM 423	<i>E. coli</i> DSM 498	<i>E. coli</i>	<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292
<i>E. coli</i> DSM 423	107	11	165	0	2
<i>E. coli</i> DSM 498	0	47		0	0
<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	0	1	1	82	3
<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292	0	0	0	4	119
total accuracy [%]	92.3		97.3		
sensitivity [%]	100	79.7	99.4	95.4	96.0
specificity [%]	95.2	100	99.1	98.6	98.4

Table S3. Identification performance of the LDA model trained with native bacteria (model N) for *E. coli* DH5 α treated with increasing concentrations of ampicillin and for bacteria treated with doubled gentamicin concentration

real class \ identified as	<i>E. coli</i> DH5 α 0.5 mg/L ampicillin	<i>E. coli</i> DH5 α 5 mg/L ampicillin	<i>E. coli</i> DH5 α 20 mg/L ampicillin	<i>E. coli</i> DSM 498	<i>P. stutzeri</i> DSM 5190
<i>E. coli</i> DSM 423	34	13	9	17	0
<i>E. coli</i> DSM 498	29	15	32	21	0
<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	0	0	0	0	30
<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292	1	0	1	0	5

Table S4. Identification performance of the LDA model trained with native bacteria (model N) for samples of *P. aeruginosa* with and without antibiotic treatment

real class identified as	<i>P. aeruginosa</i> treated with				
	no antibiotics	ampicillin	ciprofloxacin	gentamicin	sulfamethox- azole
<i>E. coli</i> DSM 423	1	2	2	0	0
<i>E. coli</i> DSM 498	1	4	2	1	2
<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	0	36	0	2	1
<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292	59	45	40	41	32
total accuracy [%]	96.7	93.1	90.9	97.7	94.3

Tables S5. A-E Classification and identification performance of the LDA model trained with spectra of bacteria without and with ciprofloxacin treatment (model NC). Table S5A shows the classification results. Tables S5B-E show the identification results for bacteria grown without antibiotics (B) with ampicillin (C), gentamicin (D) and sulfamethoxazole (E). Identification results for ciprofloxacin-treated bacteria are shown in table 1 in the main text.

S5. A Classification of bacteria without treatment and with ciprofloxacin treatment with model NC

assigned to \ real class	<i>E. coli</i> DSM 423	<i>E. coli</i> DSM 498	<i>E. coli</i>	<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292
<i>E. coli</i> DSM 423	279	58	565	3	2
<i>E. coli</i> DSM 498	49	179		1	2
<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	3	0	3	222	8
<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292	0	0	0	15	270
total accuracy [%]	87.1		96.8		
sensitivity [%]	84.3	75.5	99.3	92.1	95.7
specificity [%]	91.8	93.9	98.5	98.7	98.0

S5. B Identification of bacteria without antibiotic treatment with model NC

identified as \ real class	<i>E. coli</i> DSM 423	<i>E. coli</i> DSM 498	<i>E. coli</i>	<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292
<i>E. coli</i> DSM 423	110	42	239	2	5
<i>E. coli</i> DSM 498	32	55		0	0
<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	0	0	0	114	3
<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292	0	0	0	4	153
total accuracy [%]	83.0		97.3		
sensitivity [%]	77.5	56.7	100	95.0	95.0
specificity [%]	87.0	92.4	97.5	99.3	98.9

S5. C Identification of bacteria treated with ampicillin with model NC

real class identified as	<i>E. coli</i> DSM 423	<i>E. coli</i> DSM 498	<i>E. coli</i>	<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292
<i>E. coli</i> DSM 423	46	18	115	1	0
<i>E. coli</i> DSM 498					
<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	0	0	0	28	1
<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292	0	0	0	22	43
total accuracy [%]	67.9		87.7		
sensitivity [%]	65.7	60.0	100	53.9	95.6
specificity [%]	86.6	84.4	96.9	99.4	86.8

The confusion table for ciprofloxacin-treated bacteria is given in the main text as table 2.

S5. D Identification of bacteria treated with gentamicin with model NC

real class identified as	<i>E. coli</i> DSM 423	<i>E. coli</i> DSM 498	<i>E. coli</i>	<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292
<i>E. coli</i> DSM 423	40	9	101	0	0
<i>E. coli</i> DSM 498					
<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	0	0	0	37	1
<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292	0	1	1	15	52
total accuracy [%]	84.5		91.8		
sensitivity [%]	87.0	82.1	99.0	99.4	89.6
specificity [%]	94.4	96.0	100	97.4	89.6

S5. E Identification of bacteria treated with sulfamethoxazole with model NC

real class identified as	<i>E. coli</i> DSM 423	<i>E. coli</i> DSM 498	<i>E. coli</i>	<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292
<i>E. coli</i> DSM 423	99	4	165	0	0
<i>E. coli</i> DSM 498	8	54		0	1
<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	0	1	1	86	6
<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292	0	0	0	0	117
total accuracy [%]	94.7		97.9		
sensitivity [%]	92.5	91.5	99.4	100	94.4
specificity [%]	98.5	97.2	99.5	97.6	100

Tables S6. A-F Classification and identification performance of the LDA model trained with spectra of bacteria with ampicillin treatment (model A). Table S6A shows the classification results. Tables S6B-F show the identification results for bacteria grown without antibiotics (B) with ampicillin (C), ciprofloxacin (D), gentamicin (E) and sulfamethoxazole (F)

S6. A Classification of bacteria with ampicillin treatment with model A

real class assigned to	<i>E. coli</i> DSM 423	<i>E. coli</i> DSM 498	<i>E. coli</i>	<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292
<i>E. coli</i> DSM 423	207	12	362	3	2
<i>E. coli</i> DSM 498	6	137		0	0
<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	0	0	0	75	5
<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292	0	0	0	5	99
total accuracy [%]	94.0		97.3		
sensitivity [%]	97.2	91.9	100	90.4	93.4
specificity [%]	95.0	98.5	97.4	98.9	98.9

S6. B Identification of bacteria without antibiotic treatment with model A

real class identified as	<i>E. coli</i> DSM 423	<i>E. coli</i> DSM 498	<i>E. coli</i>	<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292
<i>E. coli</i> DSM 423	123	45	238	0	11
<i>E. coli</i> DSM 498	18	52		0	0
<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	0	0	0	78	3
<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292	1	0	1	42	147
total accuracy [%]	76.9		89.0		
sensitivity [%]	86.6	53.6	99.6	65.0	91.3
specificity [%]	85.2	95.7	96.1	99.3	88.0

S6. C Identification of bacteria treated with ampicillin with model A

real class identified as	<i>E. coli</i> DSM 423	<i>E. coli</i> DSM 498	<i>E. coli</i>	<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292
<i>E. coli</i> DSM 423	68	26	114	1	1
<i>E. coli</i> DSM 498	2	18		0	1
<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	0	1	1	30	0
<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292	0	0	0	21	43
total accuracy [%]	75.0		88.2		
sensitivity [%]	97.1	40.0	99.1	57.7	95.6
specificity [%]	80.3	98.2	96.9	99.4	87.4

S6. D Identification of bacteria treated with ciprofloxacin with model A

real class identified as	<i>E. coli</i> DSM 423	<i>E. coli</i> DSM 498	<i>E. coli</i>	<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292
<i>E. coli</i> DSM 423	49	37	105	1	0
<i>E. coli</i> DSM 498	2	17		0	0
<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	0	1	1	16	4
<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292	1	0	1	44	60
total accuracy [%]	61.2		78.0		
sensitivity [%]	94.2	30.9	98.1	26.2	93.8
specificity [%]	78.9	98.9	99.2	97.1	73.2

S6. E Identification of bacteria treated with gentamicin with model A

real class identified as	<i>E. coli</i> DSM 423	<i>E. coli</i> DSM 498	<i>E. coli</i>	<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292
<i>E. coli</i> DSM 423	44	27	102	1	14
<i>E. coli</i> DSM 498					
<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	0	0	0	31	1
<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292	0	0	0	20	38
total accuracy [%]	68.6		82.6		
sensitivity [%]	95.7	51.8	100	59.6	71.7
specificity [%]	73.9	98.7	85.7	99.4	87.1

S6. F Identification of bacteria treated with sulfamethoxazole with model A

real class identified as	<i>E. coli</i> DSM 423	<i>E. coli</i> DSM 498	<i>E. coli</i>	<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292
<i>E. coli</i> DSM 423	106	20	161	0	1
<i>E. coli</i> DSM 498					
<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	0	0	0	57	0
<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292	1	4	5	29	123
total accuracy [%]	85.4	90.7	97.9		
sensitivity [%]	99.192.5	59.3	97.0	66.3	99.2
specificity [%]	92.2	100	99.5	100	86.5

Tables S7. A-F Classification and identification performance of the LDA model trained with spectra of bacteria with ciprofloxacin treatment (model C). Table S7A shows the classification results. Tables S7B-F show the identification results for bacteria grown without antibiotics (B) with ampicillin (C), ciprofloxacin (D), gentamicin (E) and sulfamethoxazole (F).

S7. A Classification of bacteria with ciprofloxacin treatment with model C

assigned to \ real class	<i>E. coli</i> DSM 423	<i>E. coli</i> DSM 498	<i>E. coli</i>	<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292
<i>E. coli</i> DSM 423	119	1	240	0	0
<i>E. coli</i> DSM 498	9	111		3	1
<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	0	0	0	105	3
<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292	1	1	2	7	119
total accuracy [%]	94.6		96.7		
sensitivity [%]	92.2	98.2	99.2	91.3	96.7
specificity [%]	99.7	96.5	98.3	99.2	97.5

S7. B Identification of bacteria without antibiotic treatment with model C

identified as \ real class	<i>E. coli</i> DSM 423	<i>E. coli</i> DSM 498	<i>E. coli</i>	<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292
<i>E. coli</i> DSM 423	51	15	237	3	0
<i>E. coli</i> DSM 498	89	82		0	3
<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	2	0	2	105	9
<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292	0	0	0	12	149
total accuracy [%]	74.4		94.4		
sensitivity [%]	35.9	84.5	99.2	87.5	92.5
specificity [%]	95.2	78.3	97.9	97.3	96.7

S7. C Identification of bacteria treated with ampicillin with model C

real class identified as	<i>E. coli</i> DSM 423	<i>E. coli</i> DSM 498	<i>E. coli</i>	<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292
<i>E. coli</i> DSM 423	21	5	115	0	0
<i>E. coli</i>	49	40		2	1
			<i>E. coli</i> DSM 498		
<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	0	0	0	31	7
<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292	0	0	0	19	37
total accuracy [%]	60.9		86.3		
sensitivity [%]	30.0	88.9	10	59.6	82.2
specificity [%]	96.5	68.9	96.9	95.6	88.6

S7. D Identification of bacteria treated with ciprofloxacin with model C

real class identified as	<i>E. coli</i> DSM 423	<i>E. coli</i> DSM 498	<i>E. coli</i>	<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292
<i>E. coli</i> DSM 423	41	1	107	0	0
<i>E. coli</i>	11	54		0	1
			<i>E. coli</i> DSM 498		
<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	0	0	0	59	11
<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292	0	0	0	2	52
total accuracy [%]	88.8		94.0		
sensitivity [%]	78.9	98.2	100	96.7	81.3
specificity [%]	99.4	93.2	99.2	93.6	98.8

S7. E Identification of bacteria treated with gentamicin with model C

real class identified as	<i>E. coli</i> DSM 423	<i>E. coli</i> DSM 498	<i>E. coli</i>	<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292
<i>E. coli</i> DSM 423	37	0	101	1	0
<i>E. coli</i> DSM 498					
<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	0	0	0	39	2
<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292	0	1	1	12	51
total accuracy [%]	87.9		92.3		
sensitivity [%]	80.4	98.2	99.0	75.0	96.2
specificity [%]	99.4	94.0	99.0	98.7	91.6

S7. F Identification of bacteria treated with sulfamethoxazole with model C

real class identified as	<i>E. coli</i> DSM 423	<i>E. coli</i> DSM 498	<i>E. coli</i>	<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292
<i>E. coli</i> DSM 423	10	1	162	0	1
<i>E. coli</i> DSM 498					
<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	0	3	3	85	10
<i>P. thermotolerans</i> DSM 14292	1	0	1	1	112
total accuracy [%]	69.7		95.5		
sensitivity [%]	9.3	93.2	97.6	98.8	90.3
specificity [%]	99.3	69.4	99.0	95.5	99.2

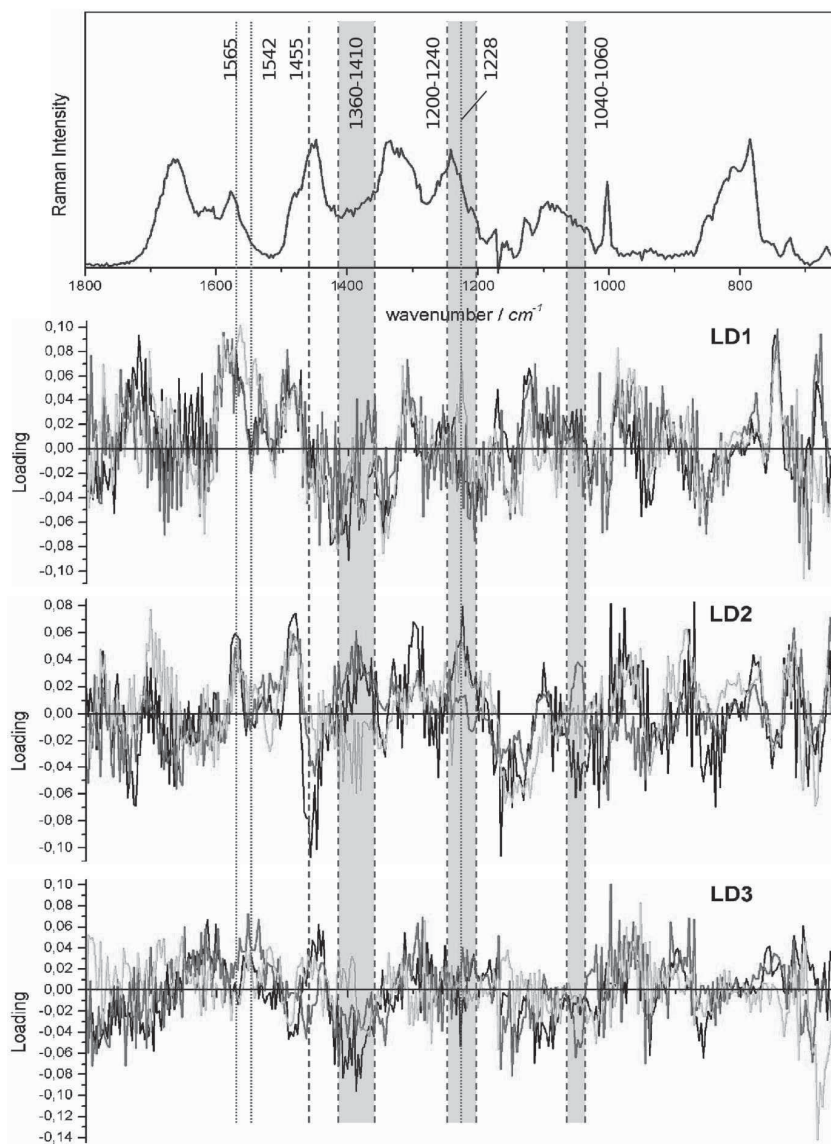


Fig. S1. Comparison of the loadings vectors for LDA models N, A and C in the fingerprint region. On top the mean spectrum of *E. coli* (blue) is displayed for guidance. For each LD, the loadings of the LDA models trained without antibiotics (model N, black), with ampicillin-treated bacteria only (model A, red) and with ciprofloxacin-treated bacteria only (model C, green) are superimposed. For clarification differences in LD1 are shown by dotted lines, differences in LD2 by dashed lines and regions are highlighted by grey bars

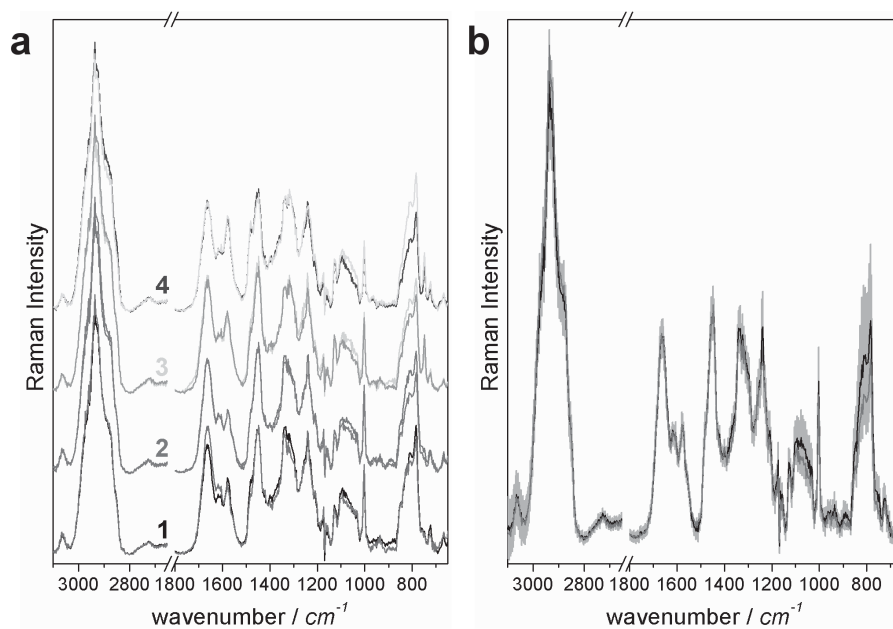


Fig. S2. Influence of antibiotic treatment on bacterial Raman spectra. The mean spectra of native bacteria and bacteria treated with ciprofloxacin are superimposed for comparison. In panel a the mean spectra of all four classes used in this work are depicted with *E. coli* DSM 423 (1) shown in black, *E. coli* DSM 498 (2) in red, *P. stutzeri* (3) in green and *P. thermotolerans* (4) in blue. The dark colour corresponds to the untreated bacteria, the pale colour to the treated ones, respectively. Panel b exemplarily shows the mean spectrum of untreated *E. coli* DSM 498 (black) with its corresponding standard deviation (grey) and the mean spectrum of ciprofloxacin-treated bacteria of the same strain (red)

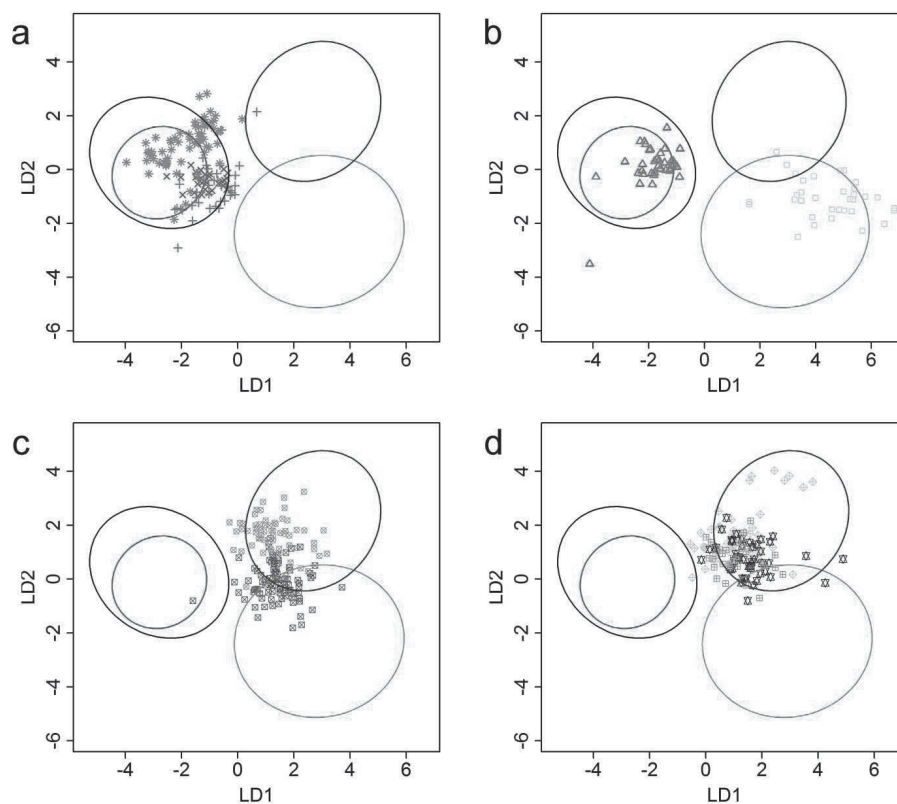


Fig. S3. Identification results with model N. Panel a depicts the identification of the ampicillin-resistant strain *E. coli* DH5 α treated with increasing concentrations of ampicillin of 0.5 mg/L (gold asterisks), 5 mg/L (purple crosses) and 20 mg/L (brown plus). Panel b shows the identification results for *E. coli* DSM 498 (pink triangles) and *P. stutzeri* (pale green squares) treated with doubled concentration of gentamicin. Identification of *P. aeruginosa* is shown with crossed symbols in panel c for bacteria grown without antibiotics (pale blue circles) or ampicillin (brown squares) and in panel d for samples treated with ciprofloxacin (golden diamonds), gentamicin (dark blue stars) and sulfamethoxazole (green squares). The distribution of the data on two panels is done for better visualization only. The ellipses represent the area, within which 95% of the classification spectra per class are located

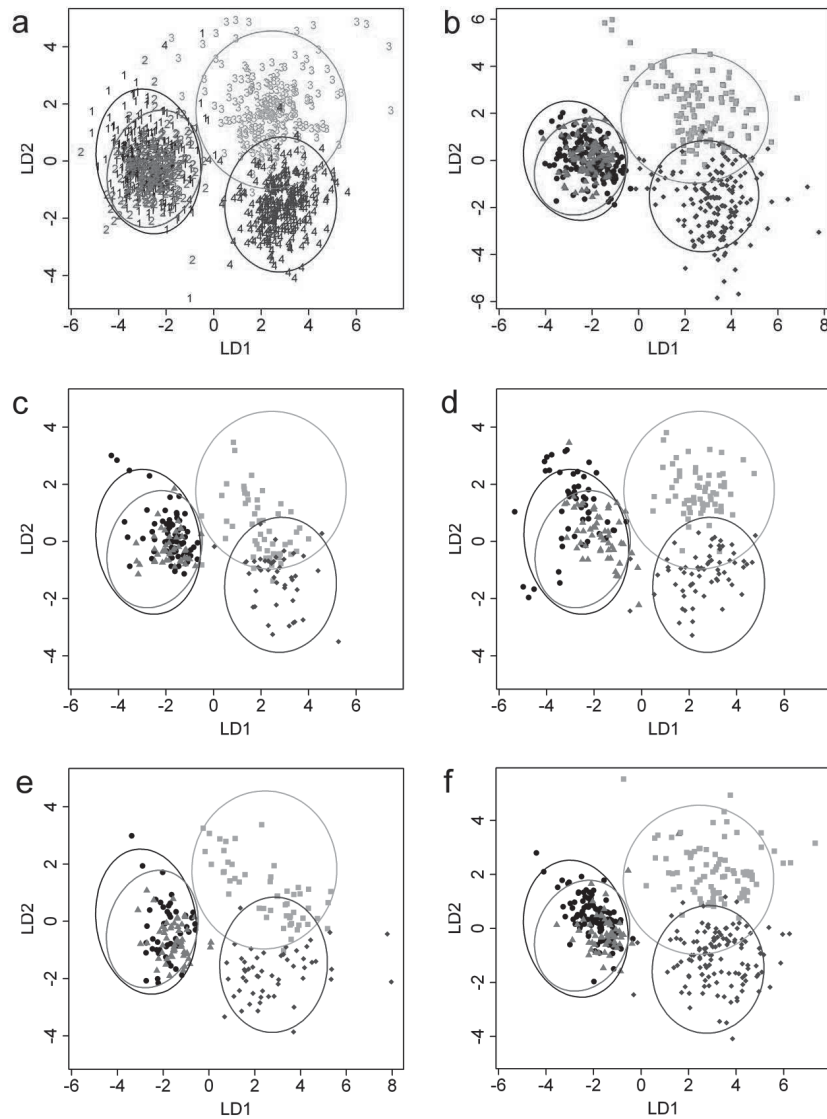


Fig. S4 Classification and identification results for the LDA model trained with untreated bacteria and bacteria treated with ciprofloxacin (model NC). Panel a displays the classification results. The numbers represent the single spectra from the training data set, the ellipses represent the area, within which 95% of the spectra per class are located. Panel b to f show the position of the identification data (symbols) in relation to the classification data (ellipses) for native bacteria (b) and bacteria treated with ampicillin (c), ciprofloxacin (d), gentamicin (e) and sulfamethoxazole (f). The colours correspond to *E. coli* DSM 423 (black), *E. coli* DSM 498 (red), *P. stutzeri* (green) and *P. thermotolerans* (blue). Note that the axes are chosen differently in each panel to display all data points

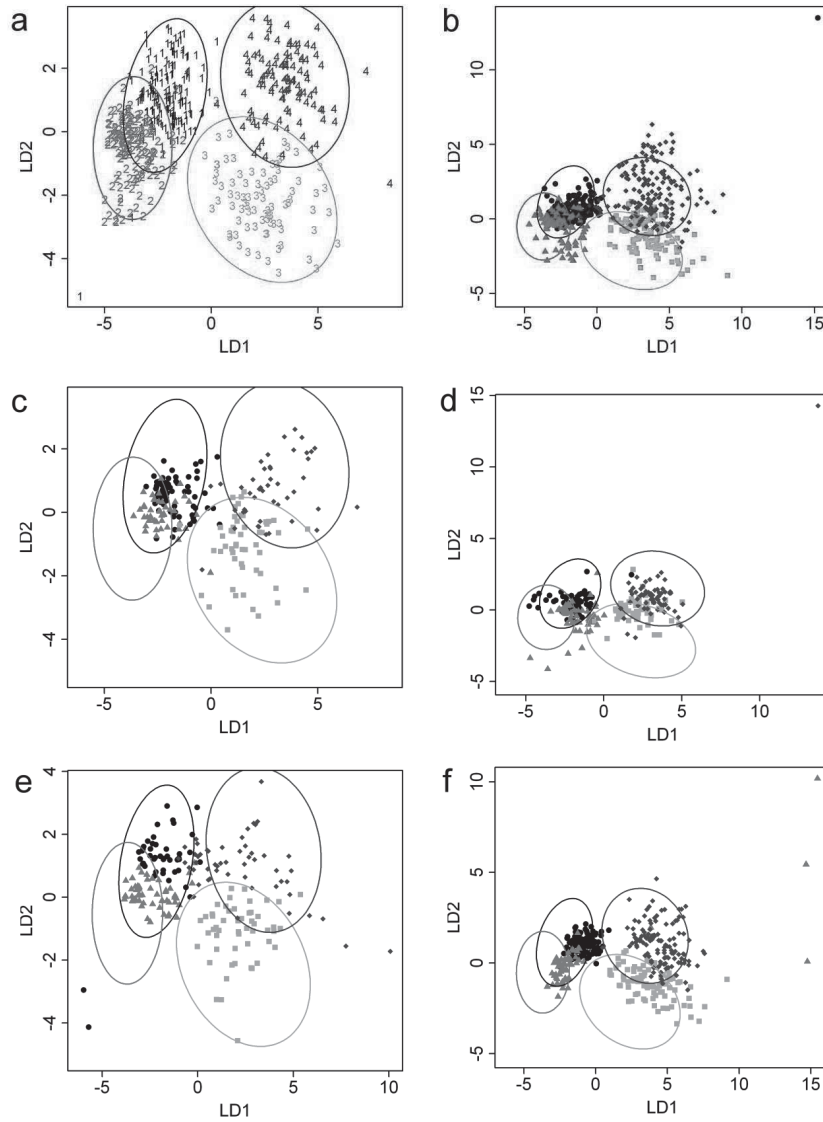


Fig. S5. Classification and identification results for the LDA model trained with ampicillin-treated bacteria (model A). Panel a displays the classification results. The numbers represent the single spectra from the training data set, the ellipses represent the area, within which 95% of the spectra per class are located. Panel b to f show the position of the identification data (symbols) in relation to the classification data (ellipses) for native bacteria (b) and bacteria treated with ampicillin (c), ciprofloxacin (d), gentamicin (e) and sulfamethoxazole (f). The colours correspond to *E. coli* DSM 423 (black), *E. coli* DSM 498 (red), *P. stutzeri* (green) and *P. thermotolerans* (blue). Note that the axes are chosen differently in each panel to display all data points

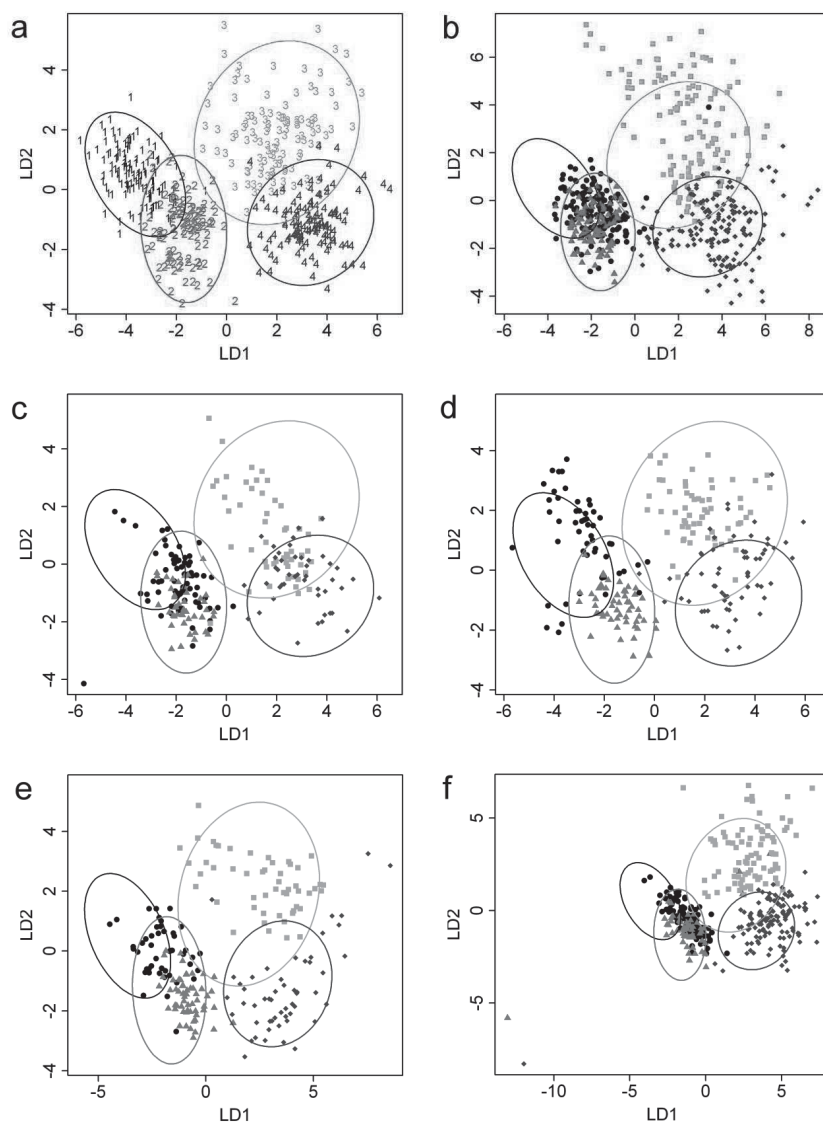


Fig. S6. Classification and identification results for the LDA model trained with ciprofloxacin-treated bacteria (model C). Panel a displays the classification results. The numbers represent the single spectra from the training data set, the ellipses represent the area, within which 95% of the spectra per class are located. Panel b to f show the position of the identification data (symbols) in relation to the classification data (ellipses) for native bacteria (b) and bacteria treated with ampicillin (c), ciprofloxacin (d), gentamicin (e) and sulfamethoxazole (f). The colours correspond to *E. coli* DSM 423 (black), *E. coli* DSM 498 (red), *P. stutzeri* (green) and *P. thermotolerans* (blue). Note that the axes are chosen differently in each panel to display all data points

References

1. Harz M, Rösch P, Peschke KD, Ronneberger O, Burkhardt H, Popp J (2005) Micro-Raman spectroscopic identification of bacterial cells of the genus *Staphylococcus* and dependence on their cultivation conditions. *Analyst* 130 (11):1543-1550. doi:10.1039/B507715J , Paper
2. Maquelin K, Kirschner C, Choo-Smith LP, van den Braak N, Endtz HP, Naumann D, Puppels GJ (2002) Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. *J Microbiol Meth* 51 (3):255-271. doi:doi:10.1016/S0167-7012(02)00127-6
3. Walter A, Reinicke M, Bocklitz T, Schumacher W, Rösch P, Kothe E, Popp J (2011) Raman spectroscopic detection of physiology changes in plasmid-bearing *Escherichia coli* with and without antibiotic treatment. *Anal Bioanal Chem* 400 (9):2763-2773. doi:OI: 10.1007/s00216-011-4819-4
4. Schmid U, Rösch P, Krause M, Harz M, Popp J, Baumann K (2009) Gaussian mixture discriminant analysis for the single-cell differentiation of bacteria using micro-Raman spectroscopy. *Chemom Intell Lab Syst* 96 (2):159-171. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.chemolab.2009.01.008
5. Movasaghi Z, Rehman S, Rehman IU (2007) Raman Spectroscopy of Biological Tissues. *Appl Spectrosc Rev* 42 (5):493-541. doi:DOI: 10.1080/05704920701551530
6. Rösch P, Harz M, Peschke K-D, Ronneberger O, Burkhardt H, Popp J (2006) Identification of Single Eukaryotic Cells with Micro-Raman Spectroscopy. *Biopolymers* 82 (4):312-316. doi:10.1002/bip.20449
7. Notingher I, Green C, Dyer C, Perkins E, Hopkins N, Lindsay C, Hench LL (2004) Discrimination between ricin and sulphur mustard toxicity in vitro using Raman spectroscopy. *J R Soc Interface* 1 (1):79-90. doi:DOI: 10.1098/rsif.2004.0008
8. Moritz TJ, Taylor DS, Polage CR, Krol DM, Lane SM, Chan JW (2010) Effect of Cefazolin Treatment on the Nonresonant Raman Signatures of the Metabolic State of Individual *Escherichia coli* Cells. *Anal Chem* 82 (7):2703-2710. doi:doi: 10.1021/ac902351a
9. Hu S, Morris IK, Singh JP, Smith KM, Spiro TG (1993) Complete assignment of cytochrome *c* resonance Raman spectra via enzymic reconstitution with isotopically labeled hemes. *JACS* 115 (26):12446-12458. doi:DOI: 10.1021/ja00079a028
10. Pätzold R, Keuntje M, Theophile K, Möller J, Mielcarek E, Ngezahayo A, Anders-von Ahlfen A (2008) In situ mapping of nitrifiers and anammox bacteria in microbial aggregates by means of confocal resonance Raman microscopy. *J Microbiol Meth* 72 (3):241-248. doi:doi:10.1016/j.mimet.2007.12.003
11. Hobro AJ, Rouhi M, Conn GL, Blanch EW (2008) Raman and Raman optical activity (ROA) analysis of RNA structural motifs. *Vib Spectrosc* 48 (1):37-43. doi:doi: 10.1016/j.vibspec.2007.11.007
12. Jarvis RM, Goodacre R (2004) Ultra-violet resonance Raman spectroscopy for the rapid discrimination of urinary tract infection bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 232 (2):127-132. doi:10.1016/S0378-1097(04)00040-0

2.2 Spatially resolved investigation of the oil composition in single intact hyphae of *Mortierella spp.* with micro-Raman spectroscopy [UM02]

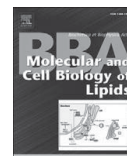
Biochimica et Biophysica Acta: Molecular and Cell Biology of Lipids, 1831, pp. 341–349, Copyright 2013.

Autorenschaft

Ute Münchberg	Konzeption des Forschungsansatzes Planung der Untersuchungen Aufarbeitung der Mikroorganismen Raman-Messungen Analyse und Auswertung der Daten Erstellen des Manuskriptes
Lysett Wagner	Planung der Untersuchungen Kultivierung der Mikroorganismen Ergebnisdiskussion Beiträge zum Manuskript
Eike T. Spielberg	Analyse der Daten Ergebnisdiskussion Beiträge zum Manuskript
Kerstin Voigt	Konzept- und Ergebnisdiskussion Revision und Überarbeitung des Manuskripts
Petra Rösch	Planung der Untersuchungen Konzept- und Ergebnisdiskussion Revision und Überarbeitung des Manuskripts
Jürgen Popp	Projektleitung Konzept- und Ergebnisdiskussion Revision und Überarbeitung des Manuskripts

Autor	Ute Münchberg	Lysett Wagner
Publikationsäquivalente	1,0	0,25

Der Nachdruck der folgenden Publikation erscheint mit freundlicher Genehmigung von *Elsevier*.



Spatially resolved investigation of the oil composition in single intact hyphae of *Mortierella* spp. with micro-Raman spectroscopy

Ute Münchberg^{a,b}, Lyseth Wagner^{c,d}, Eike T. Spielberg^{e,1}, Kerstin Voigt^{c,d}, Petra Rösch^a, Jürgen Popp^{a,f,*}

^a Institute of Physical Chemistry, Friedrich Schiller University Jena, Helmholtzweg 4, 07743 Jena, Germany

^b Jena School for Microbial Communication, Friedrich Schiller University Jena, Germany

^c Institute of Microbiology, Friedrich Schiller University Jena, Neugasse 24/25, 07743 Jena, Germany

^d Leibnitz-Institute for Natural Product Research and Infection Biology – Hans-Knöll-Institute, Dept. Molecular and Applied Microbiology, Jena Microbial Resource Collection, Neugasse 25, 07743 Jena, Germany

^e Clarendon Laboratory, Department of Physics, University of Oxford, Parks Road, Oxford OX1 3PU, UK

^f Institute of Photonic Technology, Albert-Einstein-Straße 9, 07745 Jena, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 July 2012

Received in revised form 3 September 2012

Accepted 24 September 2012

Available online 29 September 2012

Keywords:

Oleaginous fungi

Mortierellales

Mortierellomycotina

Arachidonic acid production

Polyunsaturated fatty acids (PUFAs)

Lipid bodies

ABSTRACT

Zygomycetes are well known for their ability to produce various secondary metabolites. Fungi of the genus *Mortierella* can accumulate highly unsaturated lipids in large amounts as lipid droplets. However, no information about the spatial distribution or homogeneity of the oil inside the fungi is obtainable to date due to the invasive and destructive analytical techniques applied so far. Raman spectroscopy has been demonstrated to be well suited to investigate biological samples on a micrometre scale. It also has been shown that the degree of unsaturation of lipids can be determined from Raman spectra. We applied micro-Raman spectroscopy to investigate the spatial distribution and composition of lipid vesicles inside intact hyphae. For *Mortierella alpina* and *Mortierella elongata* distinct differences in the degree of unsaturation and even the impact of growth conditions are determined from the Raman spectra. In both species we found that the fatty acid saturation in the vesicles is highly variable in the first 600 µm of the growing hyphal tip and fluctuates towards a constant composition and saturation ratio in all of the remaining mycelium. Our approach facilitates *in vivo* monitoring of the lipid production and allows us to investigate the impact of cultivation parameters on the oil composition directly in the growing hyphae without the need for extensive extraction procedures.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Fungi of the genus *Mortierella* are known to produce highly unsaturated lipids. Since they are a potential source for highly valuable pharmaceuticals and food ingredients [1,2], numerous studies have been carried out to determine the amounts and composition of lipids from fungi. These fungal lipids differ from those of higher plants in their pattern of unsaturation because they are able to produce arachidonic acid (AA, C20:4 Δ5,8,11,14) and eicosapentaenoic acid (C20:5 Δ5,8,11,14,17) [1,3]. Several species can also produce other valuable polyunsaturated fatty acids in significant amounts, such as linoleic acid, γ-linoleic acid and dihomogamma-linoleic acid [1]. It has been shown, that the oil composition is very diverse and can be influenced by many factors. Apart from variations in the oil composition for different species [1,3–6] the influence of cultivation conditions like

temperature, age of the culture, medium composition (carbon source, nitrogen source, pH etc.) or supplementation with other oils has been documented [1,6–10].

The established standard method for these analyses is gas chromatography (GC). After the mycelia are dried and subsequently homogenized by grinding or sonication, the lipids are transformed into the fatty acid methyl esters (FAMES) using aggressive chemicals such as boronic trifluoride [4,7,8] or trimethyl sulphonium hydroxide [11,12]. GC-analysis of the FAMES then gives detailed lipid composition with high accuracy.

However, even though GC can result in extensive insight into the lipid composition, the nature of the experiment and the necessary pretreatment of the sample result in a number of major drawbacks: its extractive nature requires relatively large sample volumes, the results always represent the mean composition and any spatial information about the lipid composition within the hyphae and possible variations are lost.

These drawbacks can be countered by using vibrational spectroscopy. Infrared absorption (IR) and Raman spectroscopy provide fingerprint-like information of a sample composition and do not require extensive sample preparation or chemical pretreatment. As they are non-destructive, they even offer the possibility to monitor organisms during their growth.

* Corresponding author at: Institute of Physical Chemistry, Friedrich Schiller University Jena, Helmholtzweg 4, 07743 Jena, Germany. Tel.: +49 3641 948 320; fax: +49 3641 948 302.

E-mail address: juergen.popp@uni-jena.de (J. Popp).

¹ Present address: Inorganic Chemistry I, Ruhr-University Bochum, Universitätsstraße 150, 44780 Bochum, Germany.

Raman spectroscopy is especially well applicable to investigate biological samples because in contrast to IR absorption spectroscopy water does not impair the measurements since it is a weak Raman scatterer. Therefore, Raman measurements can be performed in aqueous solutions and also on organisms as has been shown on plants [13,14], human tissue [15] or even living animals [16–18].

In combination with optical microscopy, micro-Raman spectroscopy represents a method particularly well suited for spatial investigations of samples. It allows for a spatial resolution down to a single micrometre and offers the possibility to study intact morphological structures spectroscopically. The power of this technique has been shown by the analysis of a variety of biological samples such as human tissues [19], single tissue cells [20] and their organelles [21] as well as microorganisms like bacteria and yeasts [22–28]. Furthermore, also the distribution of essential oils in various plants [29] and seeds [30] as well as lipid bodies inside the xylem of trees [31] have been investigated without any isolation or pretreatment hence providing spatial information on the sample.

In addition, Raman spectroscopy is particularly qualified for the investigation of lipid compounds since lipids exhibit a high intensity spectrum with several well defined characteristic bands. These bands can give quick information on the nature of the lipid (whether it is triglycerides, free fatty acids or phospholipids), the types of double bonds present (whether they are *cis* or *trans* configuration, isolated or conjugated) [32–35] and even the degree of unsaturation (no, few or many double bonds) [12,33,34,36]. The most informative bands for the latter determination are those that originate from the $-\text{CH}_2$ and $=\text{CH}$ groups in the fatty acids, namely two signals at 1260 and 1300 cm^{-1} . By evaluating these two peaks the degree of unsaturation has been effectively determined in biological samples as diverse as rape seeds [12], edible oils [33,35] and oils from oleaginous microalgae [37] proving the applicability of this method to very different samples. Although Raman spectroscopy cannot provide information about individual fatty acids in a lipid like GC analyses, micro-Raman spectroscopy combines its nondestructive nature with fast analysis, easy interpretation of the results and high spatial resolution.

Interestingly, little is known about why *Mortierella* fungi produce these valuable oils or their exact benefit for the fungus. Obviously, diverse carbon sources are converted into lipids, a feature which is common for all oleaginous fungi [5,38]. Studies have shown increased lipid accumulation upon nitrogen starvation, indicating their possible role as a carbon and energy source [5,39]. The numerous reports showing an increase in highly unsaturated PUFAs upon decreased growth temperature [3–5,7,8,38] may simply monitor the known fact that membranes adapt to low temperatures with increased incorporation of highly unsaturated fatty acids or they can be the result of changed enzyme activity [3]. However, up to now the focus of research has been mainly on the biotechnological exploration of the oil production. Knowledge of the physiological relevance could be beneficial for an efficient manipulation of the lipid production.

To elucidate the biological function, knowledge of the spatial and homogeneity distribution can be very helpful. Even though some plant samples have been investigated with micro-Raman spectroscopy regarding the spatial distribution of lipids or essential oils therein, no information on the homogeneity of these oils within the tissue is available [29,30,40]. Giarola and coworkers performed micro-Raman investigations on different samples of mouse fat tissue and they describe a variation of 3% in peak intensity for different measurement positions of one sample that is assumed to be homogeneous [41]. However, these measurements were performed on bulk samples and did not investigate the spatial distribution of the lipids within the tissue.

Therefore, we investigate intact oleaginous fungi of the genus *Mortierella* *in vivo* applying micro-Raman spectroscopy. Since most hyphae have a diameter of few micrometres, micro-Raman spectroscopy offers exactly the spatial resolution that is needed for the investigation of the vesicles visible in hyphae of *Mortierella* species. The

combination with microscopy allows the directed analysis of selected structures, for example the fast and non-destructive analysis of single vesicles inside intact fungal hyphae. In our study we apply this technique to two species of *Mortierella*, *Mortierella alpina* and *Mortierella elongata*, two prominent oil producers among mortierellalean fungi [1,3,4,6] in order to examine the spatial distribution and composition of the oils in single hyphae and to investigate the influence of position, hyphal morphology or age on the oil composition. Since *M. alpina* and *M. elongata* are phylogenetically very distant from each other [42], this high phylogenetic distance implies a representative taxonomic coverage, possibly rendering our investigations universal for all mortierellalean fungi.

2. Materials and methods

2.1. Cultivation of fungal samples

For inoculation small blocks of agar from fungal pre-cultures of *M. alpina* and *M. elongata* were placed onto solid glycerin medium (GYA) [6] or malt extract agar plates (MEA, 2% malt extract, 2% glucose, 0.2% peptone from soy bean, 2% agar). Sterile slides of fused silica were placed near the inoculation blocks and the samples were incubated at either 18 °C or room temperature until a monolayer of hyphae was grown onto approximately half of the slide. For each species a growth temperature was chosen that ensured sufficient biomass production for the respective analyses during the cultivation time.

2.2. Sample preparation

The fused silica slides were carefully removed from the agar plates and placed under the microscope of a micro-Raman setup. For measurements single hyphae were selected directly with the micro-Raman setup based on their appearance in the microscopic image. Pictures of the measurement sites were obtained prior to measurements for subsequent correlation of the spectral data to morphology, especially the distance of the measurement points from the tip of the hyphae.

2.3. Raman measurements

Micro-Raman measurements were performed with a Bio Particle Explorer (RapID) using a solid-state frequency doubled Nd:YAG laser (LCM-S-111-NNP25, Laser-export Co. Ltd.) at 532.11 nm and an incident laser power on the sample of approximately 7 mW. The laser was focused onto the sample with a 100× objective (Olympus MPLFLN 100×BD). The Raman back scattered light was collected with the same objective, passed through a single stage monochromator (Horiba Jobin Yvon, HE532, 920 lines/mm) and detected with a Peltier-cooled CCD camera (DV401A-BV, Andor Technology). The spectral resolution of the setup was approximately 8 cm^{-1} . Spectra were recorded from 3186 cm^{-1} to -113 cm^{-1} with a preburning time of 15 s and an acquisition time of 15 s.

2.4. Data processing

All calculations were performed with the Matlab version 7.4. Two subsequent spectra, each recorded half of the total acquisition time, are combined calculating their mean while deviations greater than two times the standard deviation from the mean are considered to be cosmic spikes. In these cases the data point in the mean spectrum is substituted by the lower value from the two spectra, *i.e.* the spectrum without the cosmic spike. The resulting combined spectrum is background corrected in the region of 900–1800 cm^{-1} with a linear regression fit (window size 150). The two peaks of interest (at 1260 and 1300 cm^{-1}) are fitted with a Lorentzian peak profile in the region of 1200–1350 cm^{-1} with a nonlinear least square fitting

algorithm. The peak maximum is determined from the fit for each peak and the ratio of the two values is calculated to $I(-\text{CH}_2)/I(=\text{CH}_{\text{cis}})$ [12,33,36,41]. Peak intensity ratios that obviously result from problems in fitting one or both peaks of interest were excluded from further evaluations.

3. Results and discussion

In hyphae of *Mortierella* species vesicular structures are often visible in the microscopic image. They can vary greatly in shape and size (see Fig. 1) and are assumed to contain the fungal oil. In Fig. 2A and B microscopic images of a typical hypha are shown. The vesicles can be observed very clearly in the dark field image in Fig. 2B and are marked by the circles, whereas in the bright field image in Fig. 2A the hypha itself is visible more clearly. If a hypha is measured at positions that show no vesicles in the microscopic image, such as position *a* in Fig. 2A, the resulting spectra (Fig. 2C spectrum a) show numerous overlapping peaks of similar intensities. This is a characteristic pattern for the fingerprint of a whole organism with its typical mixture of lipids, proteins, carbohydrates, RNA, DNA and others. Similar spectra are obtained for example from bacteria, yeasts or animal tissue [20,22,27,43–46].

Since the hyphal spectra are not dominated by lipid signals, the fungal oil is not to be found distributed homogeneously in the cytoplasm. This can be expected since the hydrophobic lipids will aggregate in the hydrophilic cytoplasm and free fatty acids are potentially harmful to the cell [47,48].

On the other hand when measuring the vesicular structures inside the hyphae (Fig. 2A, position *b*), a clearly different spectral pattern is observed. This new spectrum (spectrum b in Fig. 2C) is dominated by a few very distinct bands that all can be attributed to lipid structures [12,33,36,41,49]. The signal at 1656 cm^{-1} is typical for the stretching vibration of isolated, *cis*-substituted carbon double bonds. Signals at 1437 and 1300 cm^{-1} can be attributed to the deformation and torsion vibrations of $-\text{CH}_2$ groups respectively. At 1262 cm^{-1} the deformation vibration of *cis*-substituted $=\text{CH}$ groups is visible and the signal at 1742 cm^{-1} originates from $\text{C}=\text{O}$ stretching vibrations of lipid ester bonds. An assignment of the bands and the corresponding literature is given in Table S1. The comparison of the vesicle derived spectrum b to the spectrum d of the exemplary reference triglyceride triarachidonin in Fig. 2C shows that the spectral pattern from the vesicle is very similar to that of pure triglycerides. This proves that these vesicles are indeed predominantly composed of oil.

Upon comparison of the vesicle spectra from different *Mortierella* species variations in the peak intensities become apparent. In Fig. 2C spectra b and c are obtained from oil vesicles of *M. alpina*

and *M. elongata*, respectively. For the two bands at 1300 and 1260 cm^{-1} a difference in the peak intensities is visible. These two bands are characteristic signals of $-\text{CH}_2$ groups and $=\text{CH}$ groups and can be used to determine the degree of unsaturation in lipid samples by calculating the ratio of the two peak intensities to $I(-\text{CH}_2)/I(=\text{CH}_{\text{cis}})$ [12,33,36,41]. The more double bonds the fatty acids contain, the more intense is the $=\text{CH}$ signal at 1260 cm^{-1} . Correspondingly the peak intensity of the methylene signal at 1300 cm^{-1} decreases because the $-\text{CH}_2$ groups are replaced by $=\text{CH}$ groups. This results in a high peak intensity ratio for fatty acids with few double bonds (low degree of unsaturation) and a decreasing peak intensity ratio as the degree of unsaturation increases (corresponding to fatty acids with many double bonds). For *M. alpina* the spectrum indicates a low peak intensity ratio and thus a high degree of unsaturation while for *M. elongata* the ratio is higher and hence the fatty acids are less unsaturated. This is in agreement with publications that investigated the oil composition of different *Mortierella* species by GC. For *M. alpina*, Jang et al. as well as Shimizu et al. found much higher relative amounts of highly unsaturated fatty acids such as AA in the oils than for *M. elongata* [3,4,6].

Thus measuring single vesicles inside intact hyphae is feasible. However, for quantification of the spectral data we first have to determine the reproducibility of our method. Measurements on mice fat tissue have been performed with a variation in peak intensity of only 3% [41], but for fungal hyphae the error may be different. Since the samples are not as homogeneous in morphology and composition as bulk fat tissue, the measurement error is expected to be larger when single oil droplets within filamentous hyphae are investigated. Therefore, we first ascertained the stability and reproducibility of our method by repeated measurements on single vesicles inside the hyphae.

3.1. Variance of measurement

Single large oil droplets were chosen in intact hyphae. Between the measurements the position of the sample under the microscope (*x* and *y* direction) and the focus (*z* direction) were changed and readjusted to account for variations of the measurement positioning while the measured oil droplet itself is the same. A schematic figure of an exemplary vesicle under investigation is depicted in Fig. 3A. The vesicles were measured at different *x* positions, labelled –2 to 2, and different *z* positions, labelled bottom, centre and top, respectively. Variations in *z* position of the vesicle may result in changing contributions of the cell wall or the fused silica substrate to the spectrum, while different *x* positions can account for spectral information from the cytoplasm that may occur at the outer positions of a vesicle.

Fig. 3B and C shows the peak intensity ratios from the measurements for one representative droplet of each species. A clear difference in the peak intensity ratio for the two species can be observed with *M. alpina* (\square) always showing the lower values. This can already be expected from the raw spectra in Fig. 2C and is in agreement with other investigations that report higher percentages of AA in the extracted oils of different *M. alpina* strains than for *M. elongata* (\triangleleft) [3,4,6]. AA with its four double bonds results in a high peak intensity for the double bond associated peaks and hence a low peak intensity ratio.

In Fig. 3B the peak intensities at different *x* positions are shown. At each position, five spectra were measured and a mean and standard deviation were calculated. For each species the mean values for the different positions are very similar. The standard deviations vary slightly, but no trend can be observed. Also the standard deviations are similar for both species, which indicates that the variations are not due to the sample but to the method. An overall standard deviation of 0.022 units can be determined from these measurements irrespective of the fungal species or the mean peak intensity ratio.

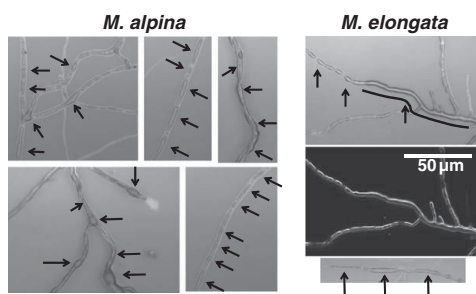


Fig. 1. Images of oil vesicles. The microscopic images of hyphae show different sizes and forms of oil vesicles in both, *M. alpina* (left) and *M. elongata* (right). Vesicles are indicated by arrows, but the indication is not exhaustive.

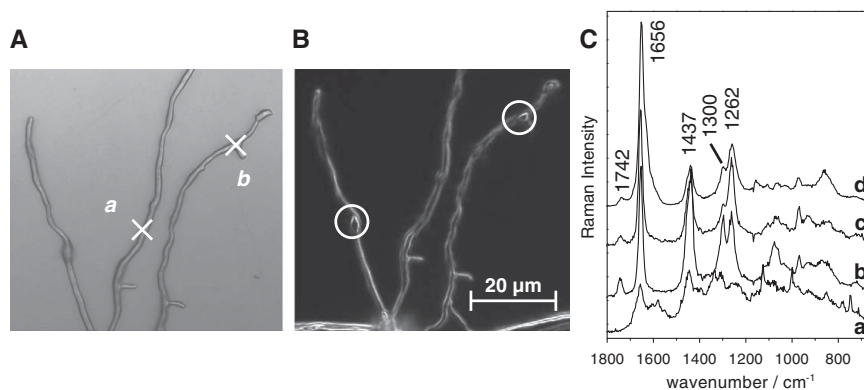


Fig. 2. Panel A shows the bright field image of a hyphal detail. Exemplary measurement positions for hyphal spectra (a) and a vesicle (b) are marked with an \times . Panel B shows the same detail in the dark field. The vesicles can be seen very clearly and are marked with circles. In panel C typical spectra of the samples under investigation are depicted. Spectra of pure hypha without vesicle (a) and from a vesicle (b) of *M. elongata* are shown. For comparison also the spectra from an oil vesicle of *M. alpina* (c) and of an exemplary pure reference triglyceride (triarachidonin, d) are depicted. Spectra are corrected for cosmic spikes only and plotted with y shift for better visualisation. The spectrum of *M. alpina* is shown in double intensity.

On the other hand, the examination of variations in z position in Fig. 3C shows, that the mean values for each species are more heterogeneous between different z positions while the standard deviation per z position is much smaller than per x position. For *M. elongata* this may be due to the fact, that only four spectra per z position were recorded. But for *M. alpina* five spectra per z position were used,

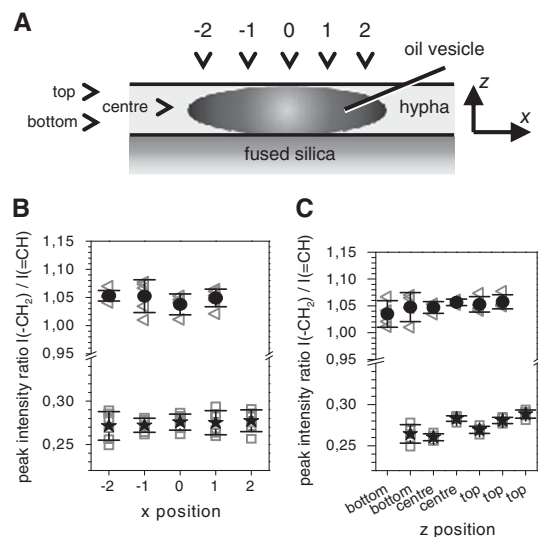


Fig. 3. Repeated measurements of single oil vesicles. Panel A shows the schematic figure of an oil vesicle inside a hypha. The vesicles were measured repeatedly at up to five different positions on the x axis (numbered -2 to 2) and three different positions on the z axis (top, centre, bottom). For each of the obtained spectra the peak intensity ratio of the two peaks at 1262 cm^{-1} and 1300 cm^{-1} was calculated as described in the text. Panel B illustrates the variations for repeated measurements along the x axis of a vesicle. Panel C shows the identical measurements but along the z axis. For *M. alpina* the measured values are shown as \square and the mean values as \star and for *M. elongata* the measured values are indicated by \triangleleft and the mean values by \bullet . Mean values are depicted with the single standard deviation.

which is the same number used in the calculations for different x positions, and here the differences in mean and standard deviation are even more pronounced. These variations cannot be attributed to spectral information from other (biological) structures, since measurements in similar focal planes do not always result in similar values. For example in *M. alpina* the two mean values obtained in central focus positions show the lowest and highest mean value of all the measurements.

Hence the focal plane has distinct impact on the measurement results while the lateral position is of negligible importance. Since the oil composition within the measured vesicles is assumed to be constant during the measurement time, the standard deviation of 0.022 units appears to be inherent in the method. Therefore, for further data interpretation differences in the results that are smaller than two times this standard deviation, which accounts for 95% of the data, are considered to not reflect differences in the actual degree of unsaturation.

3.2. Variance within a single hypha

With the reproducibility of our method being determined we can now evaluate the oil composition at different positions within a hypha. For this purpose we measured numerous oil vesicles inside single hyphae of various lengths with the tip being the zero position for the spatial measurements.

For two exemplary hyphae per species the peak intensity ratios at different distances from the hyphal tip are depicted in Fig. 4. Again the different oil composition in both species is reflected by different peak intensity ratios with *M. alpina* showing the higher degree of unsaturation in the oils. However, when comparing the values for the two hyphae of each species, which were grown under different conditions, further differences in the peak intensity ratios are observed. The two samples of *M. elongata* were grown on the same medium and at the same temperature, but the sample depicted by squares is five days older than the one depicted by diamonds. The older sample shows a lower peak intensity ratio translating into a higher degree of unsaturation. This is in accordance with other researchers' findings that report increasing degree of unsaturation for the oils and increasing amounts of AA with increasing age of the cultures [6,10]. For *M. alpina* the two samples differ in the age of the culture as well as in the medium composition. While the sample with

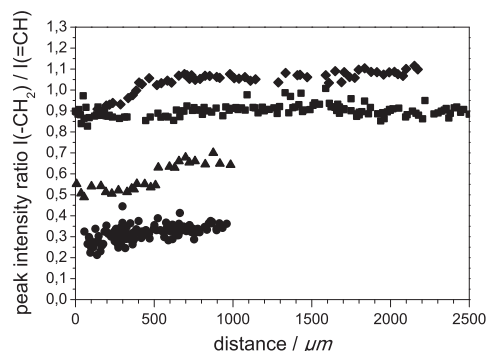


Fig. 4. Variation within hyphae. The peak intensity ratios for four different hyphae are shown with the hyphal tip being the zero position for distance measurements. All samples were grown under different conditions. *M. alpina* grew on GYA at 25 °C for 5 days (●) or on MEA at 25 °C for 7 days (▲) and *M. elongata* was grown on MEA at 18 °C for 5 days (◆) or 10 days (■).

the lower peak intensity ratio, shown as circles in Fig. 4, grew on GYA for 5 days, the one depicted by triangles was grown on MEA for 7 days. Therefore, the nutrient composition in the medium appears to have a larger impact on the oil composition than the length of growth time. For fungi of the genus *Mucor* Sajbidor et al. found higher amounts of unsaturated fatty acids, especially γ -linolenic acid, upon growth on glycerol when compared to glucose [50], which is in accordance with our findings. However, for *Mortierella* Hou et al. found no consistent effect of the carbon source on the lipid composition [6]. Their strain of *M. alpina* produced more highly unsaturated fatty acids when grown on glucose. Yet since it is known, that for different strains of *M. alpina* the lipid composition is very variable [4,5,10] we assume that our strain is more productive when grown with glycerol as carbon source. These data show that we can detect the influence of growth conditions with Raman measurements and the results are in concordance with previously reported findings.

Another interesting observation from these measurements is that the degree of unsaturation seems to vary depending on the position within the hypha. In oil vesicles at the tip lower peak intensity ratios are observed, which increase over a length of approximately 600 μm . After this distance a plateau seems to be reached as it can be seen clearly for the long hyphae of *M. elongata* (■ and ◆) in Fig. 4. Within the accuracy of our method those oil vesicles further away from the tip show identical peak intensity ratios over a length of 4200 μm , leading to the conclusion that the oil composition is identical in all older parts of a hypha.

For the long hypha of *M. elongata* depicted with squares in Fig. 4 no significant slope in the peak intensity ratios is observed because the hypha could not be followed until its tip. However, even for this filament a slight decrease is visible towards the youngest part of the hypha indicating the vicinity of its tip. A figure showing the whole hypha, where this slope can be seen more clearly, is depicted in Fig. S1.

Furthermore, not only the composition but also the occurrence of vesicles at the hyphal tip seems to be variable. While for some hyphae and branches (Fig. 4, triangles and Fig. S1) numerous oil vesicles were found at or close to the tip, for others (Fig. 4, diamonds and circles) no vesicles at all were observed in the youngest hyphal parts. Again in older parts of the hyphae these variations seem to even out.

The heterogeneous composition of oil vesicles in the young parts of the hyphae and the presence of oil vesicles at their very tip both question the sole role of the vesicles as energy source. In our

experiments either the lipids or their precursors have to be produced in old parts of the mycelium and need to be subsequently transported into the (measured) younger hyphae, since their direct uptake of nutrients is prevented by the fused silica slide.

Transportation of large amounts of lipids over long distances of several micrometres is possible but requires a lot of energy during the process. The heterogeneous composition in the youngest 600 μm of the hyphae may then be due to altered biochemical activity in the hyphal tip region. This region is known to be metabolically highly active since it is the key area of growth [51,52]. The delivered lipids can serve as energy source as well as carbon source with fatty acids selectively being incorporated into the growing membrane [53], thus explaining the variations in the vesicle composition as well as the frequency of their appearance. However, this mechanism would require a similar distribution pattern of the lipid vesicles in the hyphal tips of different samples, which is in contrast to our observations.

Transportation of the precursors and a production of the lipids at the site of storage may explain some of the compositional differences as well. It is known that lipid vesicles undergo a maturing process [54]. On the other hand, the production of lipid vesicles at hyphal tips seems unlikely since the high demand of energy and carbon sources for the growth process should prevent their conversion into storage materials.

Both cases (storage lipids at the very tip or tips void of lipid vesicles) are observed and cannot be explained consistently by the currently supposed function of the lipids. This contradiction indicates another function of the lipid vesicles for the fungus that has not been detected so far. Further research is necessary to unravel this point.

The hypha depicted by squares in Fig. 4 is the longest that was investigated. It also shows the most different morphological features. Therefore we chose it as exemplary hypha for more detailed morphological examinations.

Hotspots of hyphal growth are along the hyphal tip and the hyphal branching points [52]. Therefore, we examined the influence of branching on the oil composition. Fig. 5A shows the merged bright field images of a section from the long hypha of *M. elongata* (squares in Fig. 4) with numerous side branches varying in length between 50 and 270 μm . The measured positions are marked by the coloured dots. In Fig. 5B the respective peak intensity ratios are plotted against the measurement position. The stars represent the data from the long main hypha. For all measurement positions therein the peak intensity ratios show similar values. For clarification the confidence interval (± 2 standard deviation of the method) for the main hypha in this section is depicted by the purple lines. Since this section is the youngest of the hypha, the slightly decreasing peak intensity ratios result in a lowered confidence interval compared to the older part of the main hypha. Measurements of oil vesicles that are situated directly at the branching points are depicted in black in Fig. 5. They show no altered degree of unsaturation when compared to the main hypha. Therefore, the alteration of the oil composition most likely does not correlate with the growth velocity or hyphal branching.

A closer inspection of the numerous side branches shows that for short ones like those marked with pale green and pink dots in Fig. 5A the oil composition in the branches is the same as in the main hypha. However, longer side branches like the ones marked orange or blue show a slightly different behaviour. Although the peak intensity ratios lie within the confidence interval calculated for the main hypha, a downward slope towards the tip, i.e. towards lower micrometre values, can be observed for these longer branches. The magnitude of this slope most probably remains too small to be detected properly with our method because the branches are too short yet. For longer side branches like they were observed in the hypha of *M. alpina* illustrated by circles in Fig. 4, it becomes visible again. The branches show an upward slope from the tip of the hyphae to the older parts. Similar to the other hyphae where this slope was observed, it ends at a distance of approximately 600 μm from the tip (see also Fig. 4 and Fig. S2). After this distance

346

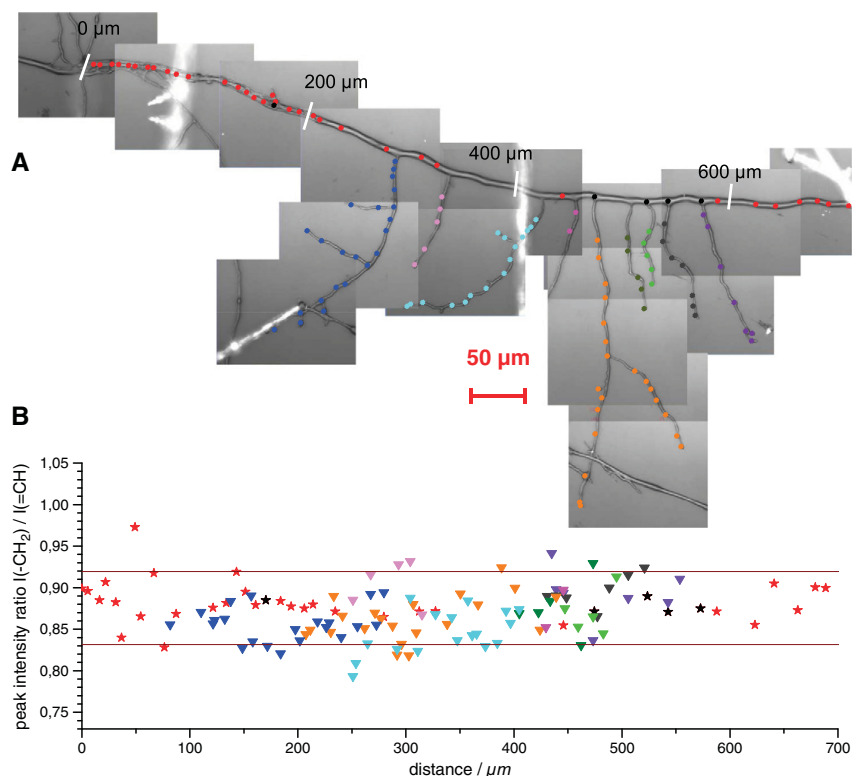
U. Münchberg et al. / *Biochimica et Biophysica Acta* 1831 (2013) 341–349

Fig. 5. Oil composition in a branched hypha of *M. elongata*. In panel A the merged microscopic image from a detail of the investigated main hypha with multiple side branches of various lengths is shown. The coloured spots in the picture mark the measurement positions. In panel B the corresponding peak intensity ratios are shown in the same colours. For the main hypha and the side branches the distance measurement went from the youngest part of the hypha to the older part. The black symbols mark branching points in the main hypha. For better visualisation the confidence interval for the main hypha (± 2 standard deviation of the method) is depicted by the purple lines. The sample was grown on MEA at 18 °C for 10 days.

the peak intensity ratios in both branches are identical and correspond to the value for the old mycelium in this sample. The magnitude of the drift is not as large as for some of the other hyphae shown in Fig. 4, but this may be due to the high degree of unsaturation in this particular sample.

From these results we conclude that within one hyphal filament the oil composition is homogeneous in older hyphal parts. In the young zone at the tip a decreased peak intensity ratio is found indicating lipids with a higher degree of unsaturation. This zone has a length of approximately 600 μm. Hyphal parts that are further away from the tip can be considered old and all show the same degree of unsaturation within one hypha. The alteration in the oil composition seems to be reserved for the apical positions in the hypha and cannot be found for branching points. For occurring side branches neither their length nor their frequency show any effect on the peak intensity ratio in the main hypha. No changes are detected in side branches shorter than 100 μm either. For longer side branches a downward slope of the peak intensity ratios occurs towards the tip. An illustration for each of the species with the microscopic image of a long, branched hypha and the respective peak intensity ratios can be found in the supplementary information in Figs. S1 for *M. elongata* and S2 for *M. alpina*.

Furthermore, an anastomosis (fusion between branches of two independent hyphae) was present in the long hypha of *M. elongata* we investigated (squares in Fig. 4) and was hence subjected to

measurement. The merged bright field image is shown in Fig. 6A. The measurement spots are marked with red dots for the original hypha, blue ones for the independent hypha and green for the connecting branch. The respective peak intensity ratios are depicted in Fig. 6B. Again for the main hypha no variations in the peak intensity ratios are observed and the vesicles in the connecting branch show the same degree of unsaturation as the main hypha. Interestingly for the oil vesicles in the independent hypha (blue circles in Fig. 6) the peak intensity ratios are identical to the values of the original hypha. This indicates that within one sample no variation in the oil composition in old parts of different hyphae can be observed.

3.3. Variance between different individual hyphae

To verify this hypha-to-hypha homogeneity we measured multiple oil vesicles in several hyphae from the same sample. The peak intensity ratios determined from those measurements are depicted in Fig. 7. Again differences in the occurrence and frequency of oil vesicles inside the hyphae are found. While for *M. alpina* oil vesicles were found directly at the tip, for *M. elongata* the hyphal tip was void of vesicles over varying lengths. Irrespective of the appearance position of lipid droplets in the hyphae, as expected they show a high variability in the youngest 600 μm partition of the hyphae, the values being scattered over a large range. However, after the length

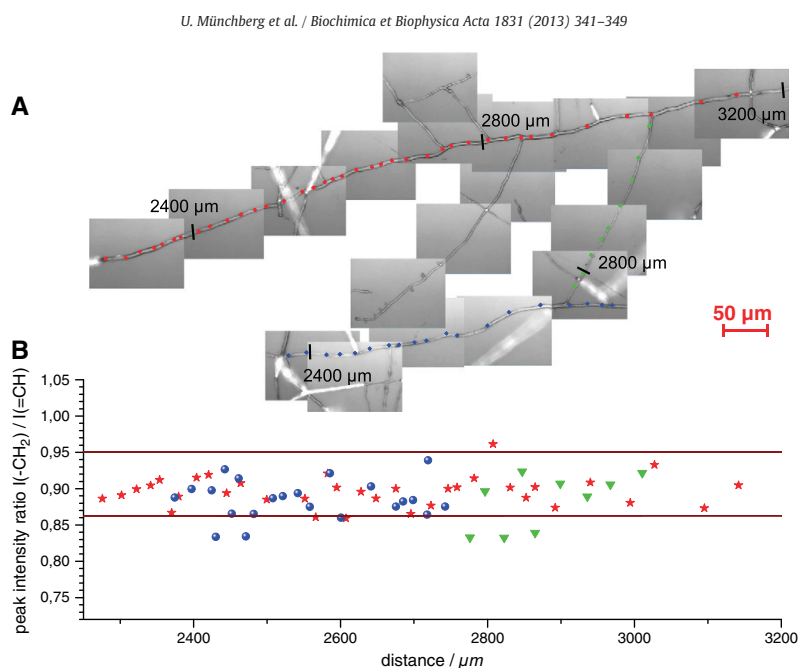


Fig. 6. Investigation of an anastomosis. Panel A shows the merged bright field image of a side branch of the hypha under investigation fusing with an independent hypha (bottom) forming an anastomosis. Measurement positions are marked red for the main hypha, green for the connecting branch and blue for the independent hypha. In panel B the peak intensity ratios are shown in the same colours, respectively. For better visualisation the confidence interval for the main hypha (± 2 standard deviation of the method) is depicted by the purple lines. The sample was grown on MEA at 18 °C for 10 days.

of 600 μm all hyphae of one species converge to the same peak intensity ratio indicating the same oil composition therein.

4. Conclusion and outlook

The application of micro-Raman spectroscopy to vesicles inside intact hyphae from the oleaginous fungi of the genus *Mortierella* provides evidence that these vesicles are predominantly composed of

oil. By calculating the intensity ratio for the two Raman peaks at 1260 and 1300 cm^{-1} we can determine the degree of unsaturation of the oil. We ascertained a standard deviation inherent to our method of 0.022 units for the peak intensity ratio. Investigations on the oil vesicles inside intact hyphae of the species *M. alpina* and *M. elongata* show distinct differences in the degree of unsaturation for both species. Even the impact of growth conditions can be monitored from the micro-Raman spectra. This provides the opportunity to monitor the lipid production *in vivo* and to investigate the influence of cultivation parameters on the oil composition directly in the growing hyphae without the need for extensive analytical investigations.

Within the accuracy of our method we found the oil composition to be homogeneous within one as well as between different individual hyphae of one fungal sample irrespective of morphological structures like hyphal branches or anastomoses. Only at the youngest 600 μm of hyphae the oil composition becomes highly variable and often changes in favour of highly unsaturated components.

Since the overall contribution of the hyphal tips to the whole mycelium is assumed to be very small, measurements of oil vesicles at random positions in the air mycelium of a fungal sample would be representative for the oil composition of the whole fungus. This would enable the rapid and easy evaluation of the oil composition with micro-Raman measurements. The effect of variations in the growth conditions on the degree of unsaturation can be evaluated without further knowledge by directly comparing the obtained peak intensity values. Furthermore, quantitative determination of the degree of unsaturation of the oil can be performed. This will facilitate the investigation of oil producing fungi such as *Mortierella* and also promote their application to produce highly unsaturated lipids on an industrial scale. The micro-Raman spectroscopic approach therefore is capable of high-throughput prescreening of fungal cultures

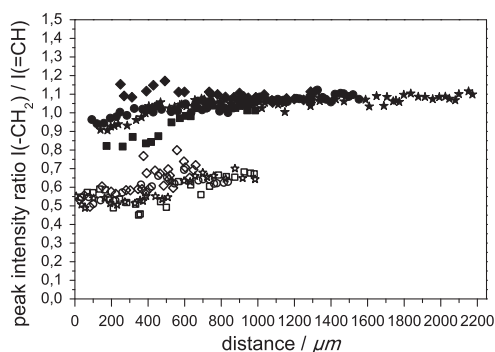


Fig. 7. Variations within one sample. For each species four hyphae were measured from the same sample. The open symbols correspond to hyphae of *M. alpina* and the solid symbols to hyphae of *M. elongata* respectively. The position of the hyphal tip is set to 0 μm . The sample of *M. alpina* was grown on MEA at 25 °C for 7 days and the sample of *M. elongata* grew on MEA at 18 °C for 5 days.

for their oil production potential and subsequent determination of oil composition.

Funding sources

This work has been funded by the DFG in the graduate school Jena School for Microbial Communication (JSMC) and the TMBWK for the excellence initiative MikroPlex (PE113-1). E.T.S. was funded by the DFG via a Rückkehrstipendium.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbali.2012.09.015>.

References

- [1] S.D. Dyal, S.S. Narine, Implications for the use of *Mortierella* fungi in the industrial production of essential fatty acids, *Food Res. Int.* 38 (2005) 445–467.
- [2] M. Certik, S. Shimizu, Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production, *J. Biosci. Bioeng.* 87 (1999) 1–14.
- [3] S. Shimizu, Y. Shinmen, H. Kawashima, K. Akimoto, H. Yamada, Fungal mycelia as a novel source of eicosapentaenoic acid: activation of enzyme(s) involved in eicosapentaenoic acid production at low temperature, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150 (1988) 335–341.
- [4] H.-D. Jang, Y.-Y. Lin, S.-S. Yang, Effect of culture media and conditions on polyunsaturated fatty acids production by *Mortierella alpina*, *Bioresour. Technol.* 96 (2005) 1633–1644.
- [5] E. Dedyukhina, T. Chistyakova, M. Vainshtein, Biosynthesis of arachidonic acid by micromycetes (review), *Appl. Biochem. Microbiol.* 47 (2011) 109–117.
- [6] C. Hou, Production of arachidonic acid and dihomo- γ -linolenic acid from glycerol by oil-producing filamentous fungi, *Mortierella* in the ARS culture collection, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35 (2008) 501–506.
- [7] H.-D. Jang, Y.-Y. Lin, S.-S. Yang, Polyunsaturated fatty acid production with *Mortierella alpina* by solid substrate fermentation, *Bot. Bull. Acad. Sin.* 41 (2000) 41–48.
- [8] C. Peng, H. Huang, X. Ji, X. Liu, J. You, J. Lu, L. Cong, X. Xu, P. Ouyang, A temperature-shift strategy for efficient arachidonic acid fermentation by *Mortierella alpina* in batch culture, *Biochem. Eng. J.* 53 (2010) 92–96.
- [9] J. Lu, C. Peng, X.-J. Ji, J. You, L. Cong, P. Ouyang, H. Huang, Fermentation characteristics of *Mortierella alpina* in response to different nitrogen sources, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 164 (2011) 979–990.
- [10] S.-Y. Ho, Y. Jiang, F. Chen, Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) content of the fungus *Mortierella alpina* isolated from soil, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 3960–3966.
- [11] A. Botha, I. Paul, C. Roux, J.L.F. Kock, D.J. Coetzee, T. Strauss, C. Maree, An isolation procedure for arachidonic acid producing *Mortierella* species, *Antonie Van Leeuwenhoek* 75 (1999) 253–256.
- [12] S. Reitzenstein, P. Rösch, M.A. Strehle, D. Berg, M. Baranska, H. Schulz, E. Rudloff, J. Popp, Nondestructive analysis of single rapeseeds by means of Raman spectroscopy, *J. Raman Spectrosc.* 38 (2007) 301–308.
- [13] E. Urlaub, J. Popp, W. Kiefer, G. Bringmann, D. Koppler, H. Schneider, U. Zimmermann, B. Schrader, FT-Raman investigation of alkaloids in the liana *Ancistrocladus heyneanus*, *Biospectroscopy* 4 (1998) 113–120.
- [14] H. Schulz, M. Baranska, Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy, *Vib. Spectrosc.* 43 (2007) 13–25.
- [15] Y.-K. Min, T. Yamamoto, E. Kohda, T. Ito, H.-O. Hamaguchi, 1064 nm near-infrared multichannel Raman spectroscopy of fresh human lung tissues, *J. Raman Spectrosc.* 36 (2005) 73–76.
- [16] X. Qian, X.-H. Peng, D.O. Ansari, Q. Yin-Goen, G.Z. Chen, D.M. Shin, L. Yang, A.N. Young, M.D. Wang, S. Nie, *In vivo* tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags, *Nat. Biotechnol.* 26 (2008) 83–90.
- [17] C. Zavaleta, A. de la Zerda, Z. Liu, S. Keren, Z. Cheng, M. Schipper, X. Chen, H. Dai, S.S. Gambhir, Noninvasive Raman spectroscopy in living mice for evaluation of tumor targeting with carbon nanotubes, *Nano Lett.* 8 (2008) 2800–2805.
- [18] M.V. Yigit, L. Zhu, M.A. Ifediba, Y. Zhang, K. Carr, A. Moore, Z. Medarova, Noninvasive MRI-SERS imaging in living mice using an innately bimodal nanomaterial, *ACS Nano* 5 (2011) 1056–1066.
- [19] R. Liu, J.-f. Liu, X.-x. Zhou, G.-b. Jiang, R. Liu, Applications of Raman-based techniques to on-site and *in-vivo* analysis, *TrAC* 30 (2011) 1462–1476.
- [20] C. Matthäus, S. Boydston-White, M. Miljkovic, M. Romeo, M. Diem, Raman and infrared microspectral imaging of mitotic cells, *Appl. Spectrosc.* 60 (2006) 1–8.
- [21] M. Harz, M. Kiehntopf, S. Stöckel, P. Rösch, T. Deufel, J. Popp, Analysis of single blood cells for CSF diagnostics via a combination of fluorescence staining and micro-Raman spectroscopy, *Analyst* 133 (2008) 1416–1423.
- [22] M. Harz, P. Rösch, J. Popp, Vibrational spectroscopy – a powerful tool for the rapid identification of microbial cells at the single-cell level, *Cytometry A* 75A (2009) 104–113.
- [23] P.C.A.M. Buijtel, H.F.M. Willemsse-Erix, P.L.C. Petit, H.P. Endtz, G.J. Puppels, H.A. Verbrugh, A. van Belkum, D. van Soelingen, K. Maquelin, Rapid identification of mycobacteria by Raman spectroscopy, *J. Clin. Microbiol.* 46 (2008) 961–965.
- [24] T.J. Moritz, D.S. Taylor, C.R. Polage, D.M. Krol, S.M. Lane, J.W. Chan, Effect of cefazolin treatment on the nonresonant Raman signatures of the metabolic state of individual *Escherichia coli* cells, *Anal. Chem.* 82 (2010) 2703–2710.
- [25] T.J. Moritz, C.R. Polage, D.S. Taylor, D.M. Krol, S.M. Lane, J.W. Chan, Evaluation of *Escherichia coli* cell response to antibiotic treatment using laser tweezers Raman spectroscopy, *J. Clin. Microbiol.* 48 (2010) 4287–4290.
- [26] M. Krause, B. Radt, P. Rösch, J. Popp, The investigation of single bacteria by means of fluorescence staining and Raman spectroscopy, *J. Raman Spectrosc.* 38 (2007) 369–372.
- [27] P. Rösch, M. Harz, K.-D. Peschke, O. Ronneberger, H. Burkhardt, J. Popp, Identification of single eukaryotic cells with micro-Raman spectroscopy, *Biopolymers* 82 (2006) 312–316.
- [28] S. Stöckel, S. Meisel, M. Elschner, P. Rösch, J. Popp, Raman spectroscopic detection of anthrax endospores in powder samples, *Angew. Chem. Int. Ed.* 51 (2012) 5339–5342.
- [29] M. Baranska, H. Schulz, S. Reitzenstein, U. Uhlemann, M.A. Strehle, H. Krüger, R. Quilitzsch, W. Foley, J. Popp, Vibrational spectroscopic studies to acquire a quality control method of eucalyptus essential oils, *Biopolymers* 78 (2005) 237–248.
- [30] K.R. Strehle, P. Rösch, D. Berg, H. Schulz, J. Popp, Quality control of commercially available essential oils by means of Raman spectroscopy, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 7020–7026.
- [31] P. Rösch, H. Schneider, U. Zimmermann, W. Kiefer, J. Popp, *In situ* Raman investigation of single lipid droplets in the water-conducting xylem of four woody plant species, *Biopolymers* 74 (2004) 151–156.
- [32] H. Najbjerg, N.K. Afseth, J.F. Young, H.C. Bertram, M.E. Pedersen, S. Grimmer, G. Vogt, A. Kohler, Monitoring cellular responses upon fatty acid exposure by Fourier transform infrared spectroscopy and Raman spectroscopy, *Analyst* 136 (2011) 1649–1658.
- [33] H. Sadeghi-Jorabchi, R.H. Wilson, P.S. Belton, J.D. Edwards-Webb, D.T. Coxon, Quantitative analysis of oils and fats by Fourier transform Raman spectroscopy, *Spectrochim. Acta A* 47 (1991) 1449–1458.
- [34] G. Bailey, R. Horvat, Raman spectroscopic analysis of the *cis/trans* isomer composition of edible vegetable oils, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 49 (1972) 494–498.
- [35] B. Muik, B. Lendl, A. Molina-Díaz, M.J. Ayora-Canada, Direct monitoring of lipid oxidation in edible oils by Fourier transform Raman spectroscopy, *Chem. Phys. Lipids* 134 (2005) 173–182.
- [36] M. Butler, N. Salem Jr., W. Hoss, J. Spoonhower, Raman spectral analysis of the 1300 cm^{-1} region for lipid and membrane studies, *Chem. Phys. Lipids* 24 (1979) 99–102.
- [37] H. Wu, J.V. Volponi, A.E. Oliver, A.N. Parikh, B.A. Simmons, S. Singh, *In vivo* lipidomics using single-cell Raman spectroscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 3809–3814.
- [38] K. Laoteng, M. Certik, S. Cheevadhanak, Mechanisms controlling lipid accumulation and polyunsaturated fatty acid synthesis in oleaginous fungi, *Chem. Pap.* 65 (2011) 97–103.
- [39] Y. Shinmen, S. Shimizu, K. Akimoto, H. Kawashima, H. Yamada, Production of arachidonic acid by *Mortierella* fungi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31 (1989) 11–16.
- [40] M. Baranska, H. Schulz, P. Rösch, M.A. Strehle, J. Popp, Identification of secondary metabolites in medicinal and spice plants by NIR-FT-Raman microspectroscopic mapping, *Analyst* 129 (2004) 926–930.
- [41] M. Giarola, B. Rossi, E. Mosconi, M. Fontanella, P. Marzola, I. Scambi, A. Sbarbati, G. Mariotto, Fast and minimally invasive determination of the unsaturation index of white fat depots by micro-Raman spectroscopy, *Lipids* 46 (2011) 659–667.
- [42] T. Petkovits, L. Nagy, K. Hoffmann, L. Wagner, I. Nyilas, T. Griebel, D. Schnabelrauch, H. Vogel, K. Voigt, C. Vágvölgyi, T. Papp, Data partitions, Bayesian analysis and phylogeny of the zygomycetous fungal family *Mortierellaceae*, inferred from nuclear ribosomal DNA sequences, *PLoS One* 6 (2011) e27507.
- [43] K. Maquelin, C. Kirschner, L.P. Choo-Smith, N.A. Ngo-Thi, T. van Vreeswijk, M. Stammeler, H.P. Endtz, H.A. Bruining, D. Naumann, G.J. Puppels, Prospective study of the performance of vibrational spectroscopies for rapid identification of bacterial and fungal pathogens recovered from blood cultures, *J. Clin. Microbiol.* 41 (2003) 324–329.
- [44] T.C. Bakker Schut, M.J.H. Witjes, H.J.C.M. Sterenberg, O.C. Speelman, J.L.N. Roodenburg, E.T. Marple, H.A. Bruining, G.J. Puppels, *In vivo* detection of dysplastic tissue by Raman spectroscopy, *Anal. Chem.* 72 (2000) 6010–6018.
- [45] M. Kirsch, G. Schackert, R. Salzer, C. Krafft, Raman spectroscopic imaging for *in vivo* detection of cerebral brain metastases, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 1707–1713.
- [46] C. Krafft, D. Codrich, G. Pelizzo, V. Sergio, Raman and FTIR microscopic imaging of colon tissue: a comparative study, *J. Biophotonics* 1 (2008) 154–169.
- [47] P. Rockenfeller, J. Ring, V. Muschett, A. Beranek, S. Büttner, D. Carmona-Gutierrez, T. Eisenberg, C. Khoury, G. Rechberger, S.D. Kohlwein, G. Kroemer, F. Madeo, Fatty acids trigger mitochondrion-dependent necrosis, *Cell Cycle* 9 (2010) 2836–2842.
- [48] V.A. van Beelen, J. Roeleveld, H. Mooibroek, L. Sijtsma, R.J. Bino, D. Bosch, I.M.C.M. Rietjens, G.M. Alink, A comparative study on the effect of algal and fish oil on viability and cell proliferation of Caco-2 cells, *Food Chem. Toxicol.* 45 (2007) 716–724.
- [49] J. De Gelder, K. De Gussem, P. Vandenebeele, L. Moens, Reference database of Raman spectra of biological molecules, *J. Raman Spectrosc.* 38 (2007) 1133–1147.
- [50] J. Sajbidor, M. Certik, S. Dobroňová, Influence of different carbon sources on growth, lipid content and fatty acid composition in four strains belonging to mucorales, *Biotechnol. Lett.* 10 (1988) 347–350.

- [51] P.M. Kirk, P.F. Cannon, D.W. Minter, J.A. Stalpers, Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi, 10th Edition Cab Intl, 2008.
- [52] A. Walter, S. Erdmann, T. Bocklitz, E.-M. Jung, N. Vogler, D. Akimov, B. Dietzek, P. Rösch, E. Kothe, J. Popp, Analysis of the cytochrome distribution via linear and nonlinear Raman spectroscopy, *Analyst* 135 (2010) 908–917.
- [53] T.C. Walther, R.V. Farese Jr., The life of lipid droplets, *BBA – Mol. Cell Biol. Lipids* 1791 (2009) 459–466.
- [54] Y. Kamisaka, N. Noda, T. Sakai, K. Kawasaki, Lipid bodies and lipid body formation in an oleaginous fungus, *Mortierella ramanniana* var. *angulispota*, *BBA – Mol. Cell Biol. Lipids* 1438 (1999) 185–198.

**Spatially resolved investigation of the
oil composition in single intact
hyphae of *Mortierella* spp. with
micro-Raman spectroscopy**

Ute Münchberg, Lysett Wagner, Eike T. Spielberg, Kerstin Voigt,
Petra Rösch, Jürgen Popp

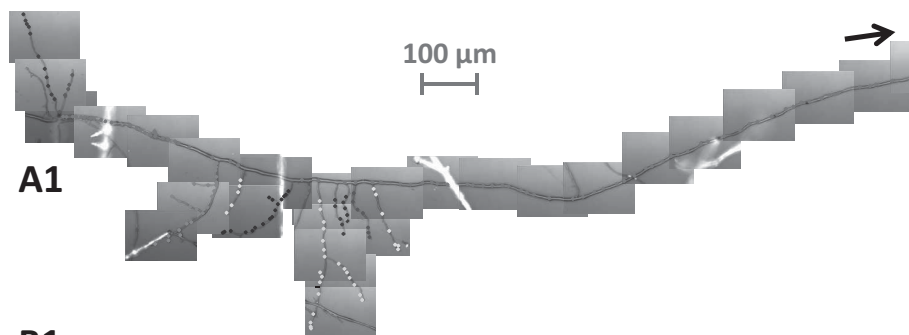
Tables

Table S1: Assignment of the major Raman bands for the vesicle and the lipid spectra according to literature.

Peak position [cm ⁻¹]	position according to reference [cm ⁻¹]	Assignment
1742	1741-1743 [1]	v(C=O)
	1742 [2]	C=O stretching vibration of ester bonds
	1743 [3]	
	1748 [4]	
1656	1654 [2]	v(C=C) _{cis}
	1654-1657 [1]	Stretching of isolated C=C double bonds
	1655 [3]	
	1656 [4]	
	1660 [5]	
1437	1400-1500 [3]	γ(-CH ₂)
	1439-1441 [1]	Scissoring deformation vibration of -CH ₂ groups
	1440 [4]	
1300	1440 [2]	
	1301 [3]	τ(-CH ₂)
	1301 [4]	twisting deformation of -CH ₂ groups
	1303 [1]	
	1303 [2]	
1262	1303 [5]	
	1261 [2]	γ(=CH)
	1263 [4]	in plane deformation of unconjugated <i>cis</i> =CH groups
	1265 [3]	
	1265-1267 [1]	
	1267 [5]	

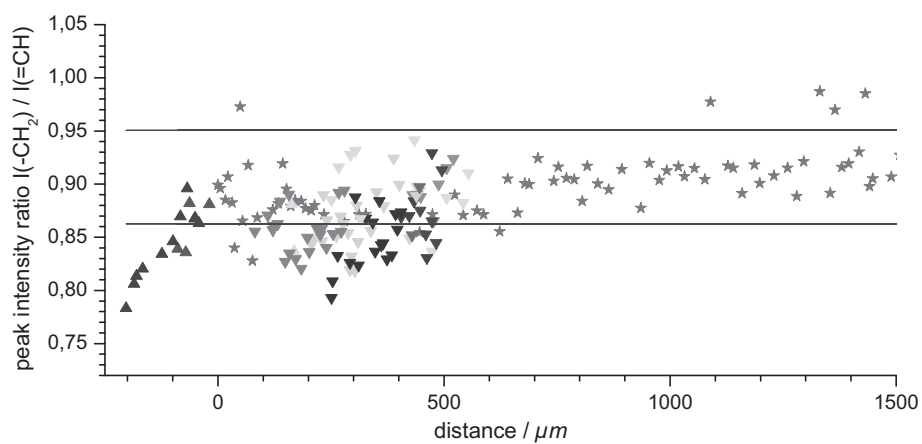
Figures

S1-1



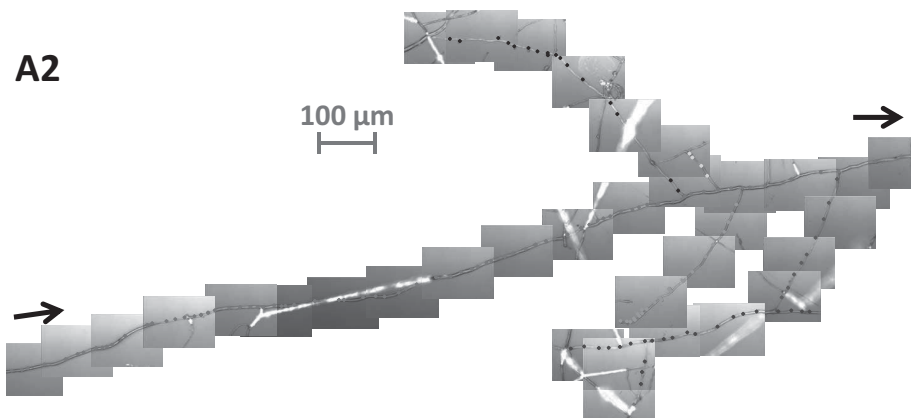
A1

B1

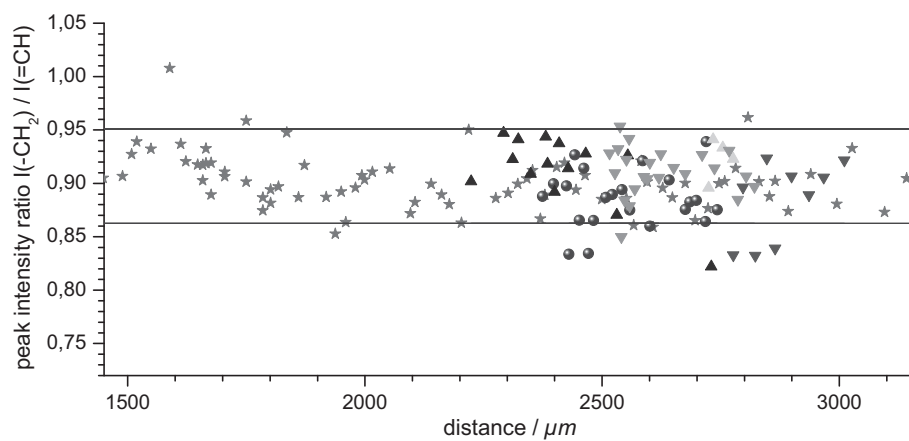


S1-2

A2



B2



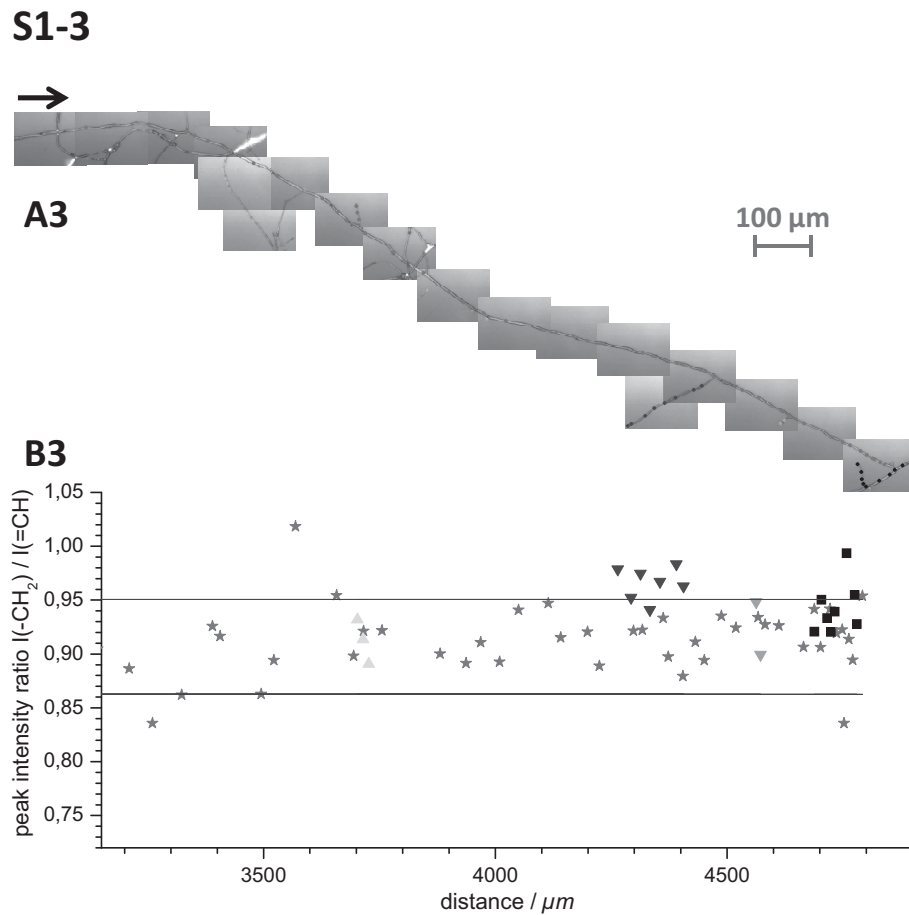


Figure S1. In panel A1-A3 the merged bright field images of a complete branched hypha of *M. elongata* are shown. Measurement positions are marked by the coloured dots. Because of the size of the hypha the image is split into three parts. The arrows indicate where the hypha continues in the next panel. In panel A1 on the left side a conglomerate of multiple hyphae can be seen. At this point the investigated hypha could not be determined unambiguously anymore and was not followed any further. Panel B1-3 show the corresponding peak intensity ratios of the respective part of the hypha in the same colours. For better visualization the confidence interval ($\pm 2 \times$ standard deviation of the method) for the values above 600 μm is depicted by the purple lines. The sample was grown on MEA at 18°C for 10 days.

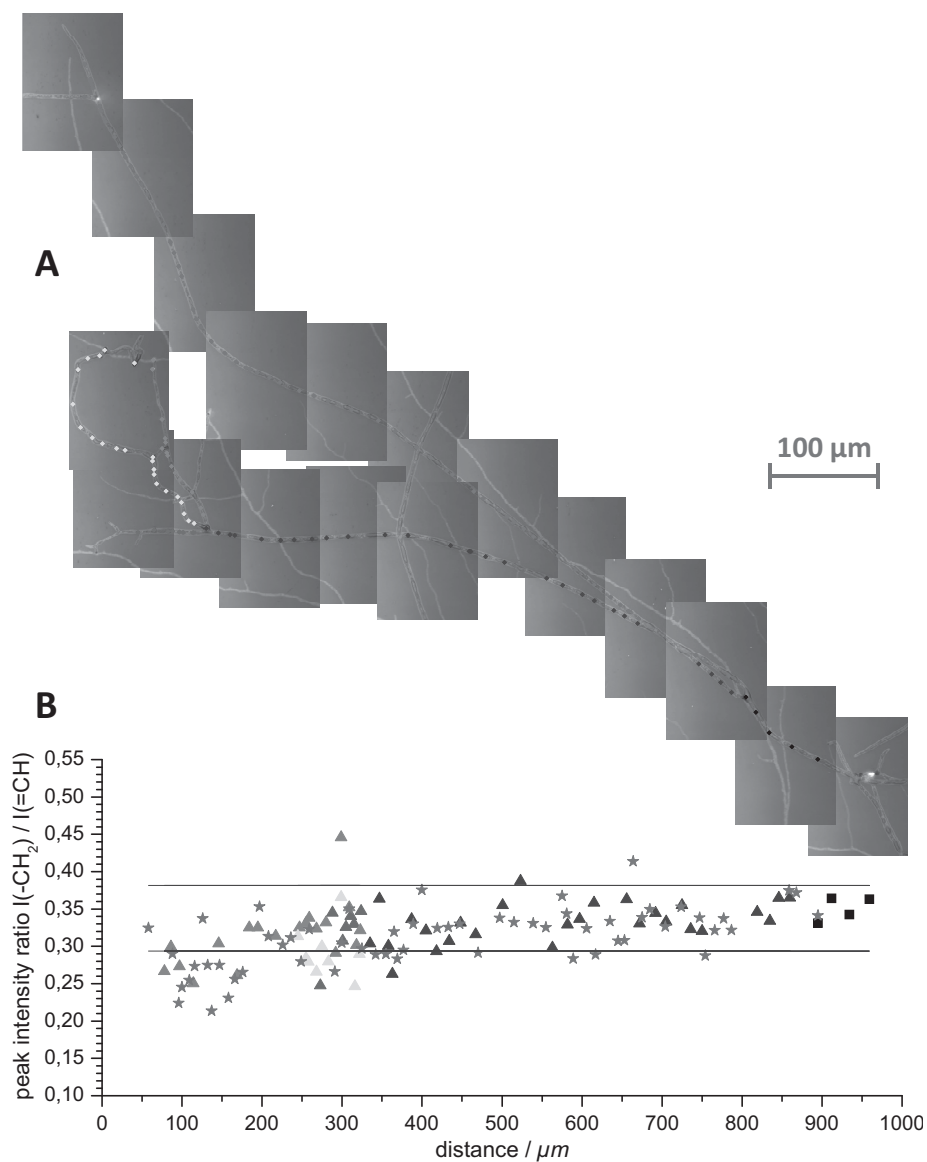


Figure S2. In panel A the merged bright field image of a complete branched hypha of *M. alpina* is shown. Measurement positions are marked by the coloured dots. On the right side a knot of several hyphae can be seen. At this point the investigated hypha could not be determined unambiguously anymore and was not followed any further. Panel B shows the corresponding peak intensity ratios in the same colours. For better visualization the confidence interval (± 2 standard deviation of the method) for the values above 500 μm is depicted by the purple lines. The sample was grown on GYA at 25°C for 5 days.

References

- [1] H. Sadeghi-Jorabchi, R.H. Wilson, P.S. Belton, J.D. Edwards-Webb, D.T. Coxon, Quantitative analysis of oils and fats by Fourier transform Raman spectroscopy, *Spectrochim. Acta A*, 47 (1991) 1449-1458.
- [2] P. Rösch, H. Schneider, U. Zimmermann, W. Kiefer, J. Popp, In situ Raman investigation of single lipid droplets in the water-conducting xylem of four woody plant species, *Biopolymers*, 74 (2004) 151-156.
- [3] J. De Gelder, K. De Gussem, P. Vandenabeele, L. Moens, Reference database of Raman spectra of biological molecules, *J. Raman Spectrosc.*, 38 (2007) 1133-1147.
- [4] S. Reitzenstein, P. Rösch, M.A. Strehle, D. Berg, M. Baranska, H. Schulz, E. Rudloff, J. Popp, Nondestructive analysis of single rapeseeds by means of Raman spectroscopy, *J. Raman Spectrosc.*, 38 (2007) 301-308.
- [5] M. Butler, N. Salem Jr, W. Hoss, J. Spoonhower, Raman spectral analysis of the 1300 cm^{-1} region for lipid and membrane studies, *Chem. Phys. Lipids*, 24 (1979) 99-102.

2.3 Quantitative assessment of the degree of lipid unsaturation in intact *Mortierella* by Raman microspectroscopy [UM03]

Journal of Lipid Research, eingereicht am 20. Dezember 2013.

Autorenschaft

Ute Münchberg	Konzeption des Forschungsansatzes Planung der Untersuchungen Aufarbeitung der Mikroorganismen Raman-Messungen Analyse und Auswertung der Daten Erstellen des Manuskriptes
Lysett Wagner	Planung der Untersuchungen Kultivierung der Mikroorganismen Beiträge zum Manuskript
Carsten Rohrer	Aufarbeitung der Mikroorganismen für Gas-chromatographische Analyse Durchführung und Auswertung Gaschromatographie-Messungen Beiträge zum Manuskript
Kerstin Voigt	Konzept- und Ergebnisdiskussion Revision und Überarbeitung des Manuskripts
Petra Rösch	Planung der Untersuchungen Konzept- und Ergebnisdiskussion Revision und Überarbeitung des Manuskripts
Gerhard Jahreis	Konzeptdiskussion Revision des Manuskripts
Jürgen Popp	Projektleitung Konzept- und Ergebnisdiskussion Revision und Überarbeitung des Manuskripts

Autor	Ute Münchberg	Lysett Wagner
Publikationsäquivalente	1,0	0,25

1 Quantitative assessment of the degree of
2 lipid unsaturation in intact *Mortierella* by
3 Raman microspectroscopy

4 Ute Münchberg(1,2), Lysett Wagner (3,4), Carsten Rohrer (5), Kerstin Voigt (3,4), Petra Rösch (1),
5 Gerhard Jahreis (5), Jürgen Popp (1,6)

6

7 (1) Institute of Physical Chemistry and Abbe Center of Photonics, Friedrich Schiller University Jena,
8 Helmholtzweg 4, 07743 Jena, Germany.

9 (2) Jena School for Microbial Communication, Friedrich Schiller University Jena, Germany.

10 (3) Jena Microbial Resource Collection. Institute of Microbiology, Friedrich Schiller University Jena,
11 Neugasse 25, 07743 Jena, Germany

12 (4) Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology – Hans-Knöll-Institute, Dept.
13 Molecular and Applied Microbiology, Adolf-Reichwein-Straße 23, 07745 Jena, Germany.

14 (5) Institute of Nutrition, Friedrich Schiller University Jena, Dornburger Straße 24, 07743 Jena,
15 Germany.

16 (6) Leibniz Institute of Photonic Technology, Albert-Einstein-Straße 9, 07745 Jena, Germany.

17

18 **short running footline** Non-destructive determination of iodine value with Raman

19

20 **corresponding author:**

21 Jürgen Popp

22 Tel.: +49 3641 948 320

23 Fax: +49 3641 948 302

24 E-Mail: Juergen.Popp@uni-jena.de

25

26 **Abstract**

27 Fungi of the genus *Mortierella* can accumulate large amounts of unusual lipids depending on species,
28 strain and growth conditions. Fast and easy determination of key parameters of lipid quality for these
29 samples is required. In this contribution we apply Raman microspectroscopy to determine the degree
30 of unsaturation for fungal lipids directly inside intact hyphae without elaborate sample handling. Six
31 *Mortierella* species were grown under varying conditions and Raman spectra of single lipid vesicles
32 were acquired. From the spectra, we calculate a peak intensity ratio $I(1270\text{ cm}^{-1})/I(1445\text{ cm}^{-1})$ from
33 the signals of =CH and -CH₂-CH₃ groups, respectively. This ratio is linked to the iodine value (IV)
34 using spectra of reference compounds with known IV. IVs of fungal samples are compared to gas
35 chromatography results. Values from both methods are in good accordance. Lipid composition is
36 found to vary between the investigated species with *M. alpina* having the most unsaturated lipid (IV
37 up to 280) and *M. exigua* the least unsaturated (IV as low as 70). We find Raman microspectroscopy
38 a suitable tool to determine the IV reliably, fast and easily inside intact hyphae without extensive
39 sample handling or treatment. The method can also be transferred to other microscopic samples.

40

41 **keywords:** oleaginous fungi; Mortierellales; Mortierellomycotina; *Mortierella antartica*; *Mortierella*
42 *elongata*; *Mortierella hyalina*; *Mortierella parvispora*; lipid bodies; polyunsaturated fatty acids;
43 arachidonic acid production

44

45 Introduction

46 In recent years, lipids produced by oleaginous microorganisms, so-called single cell oils (SCO), have
47 attracted increasing interest (1-5). In contrast to oils derived from plants or animals, which always
48 contain a mixture of saturated and unsaturated fatty acids, SCO may be composed of only very few
49 different fatty acids (1). Furthermore, highly unsaturated long chain fatty acids (HUFAs) (arachidonic
50 acid, eicosapentaenoic acid, γ -linolenic acid) can be produced in large amounts (1, 3, 5-8). These
51 traits render oleaginous microorganisms a promising source of lipids with unusual characteristics.

52 In particular fungi of the order *Mortierellales* and *Mucorales* have attracted considerable interest as
53 industrial lipid producers. They are easily cultivated in solid or liquid culture and have been shown to
54 grow on various different carbon sources (5, 9, 10) and numerous different agricultural waste
55 products (3, 10-12).

56 Furthermore, they have been shown to grow well on glycerol, a byproduct of biodiesel production
57 products (3, 13-15). This allows to convert industrial and agricultural waste into valuable products.
58 However, the lipid composition is very variable in different fungi. Some species like *M. isabellina*
59 (now *Umbelopsis isabellina* (16)) accumulate lipids with many mono- or diunsaturated fatty acids
60 suitable for biodiesel production (4, 15, 17, 18).

61 Other species like *M. alpina* produce lipids rich in unusual HUFAs like γ -linolenic acid, arachidonic
62 acid or eicosapentaenoic acid (3, 5, 6, 8, 12, 14, 19, 20) which are sought after for medical
63 applications (3, 21-25) or as dietary supplements e.g. in baby formula (1, 2, 5). But also different
64 strains of one species can have very different lipid profiles (5, 14, 20). For example in *M. alpina*,
65 arachidonic acid content in the lipid is reported to vary between 5.3 % and 78.8 % (5, 14, 20, 26).
66 Furthermore, for one strain the lipid composition can be influenced by varying the growth
67 parameters such as cultivation time and temperature, nitrogen source or carbon source (5, 6, 20, 27,
68 28).

69 Therefore, the lipid production capabilities of new fungal samples are difficult to predict and have to
70 be carefully evaluated. A rapid and easy assessment of the lipid quality of *Mortierella* strains could
71 facilitate the analyses and screening processes. Since in most cases one key parameter is the iodine
72 value (IV), the determination of the lipids' degree of unsaturation would provide a good lead.

73 A direct, fast and non-destructive method to determine the degree of unsaturation in lipid samples is
74 Raman spectroscopy. In various studies the degree of unsaturation has been determined for a very
75 diverse set of samples. Pure lipids in the form of edible oils (29-31) or oil seeds (32) have been
76 investigated as well as complex matrices like milk (33), pork (34) or fish (35, 36). However, in these

77 experiments the samples were homogeneous or spatial resolution was low. Samek et al. successfully
78 applied Raman spectroscopy to determine the IV of SCO in microalgae (2, 35, 37), but they
79 embedded their samples in a gel matrix.

80 In the present contribution we use Raman spectroscopy directly on living, intact hyphae of
81 *Mortierella* fungi to determine the IV of their lipids. For these measurements the samples do not
82 need to be preprocessed, homogenized, fixed or extracted in any way, but single lipid vesicles are
83 investigated directly. In previous work we already proved the feasibility to directly measure Raman
84 spectra of lipid vesicles inside intact mycelia (38). This method would allow to quantify the IV in
85 oleaginous microorganisms directly without elaborate sample handling, which greatly reduces the
86 sample handling and required sample amount. It also enables fast and easy spatially resolved
87 quantification of lipid unsaturation, which can help in analyzing lipid body metabolism in more detail.

88 **Materials and Methods**

89 **Chemicals**

90 Reference compounds with varying chain lengths and numbers of double bonds for Raman
91 spectroscopic measurements were obtained from Sigma, all of a purity of at least 95%. A
92 comprehensive list of the compounds and their properties is given in table 1.

93 For spectroscopic measurements droplets of 1–5 μ L were spotted onto fused silica slides.
94 Compounds that are solid at room temperature were melted prior to measurements. For each
95 compound, 10-20 Raman spectra were obtained with an acquisition time of 10 s. A structure ratio SR
96 is determined for each of the reference compounds using the formula $SR = n(=CH)/(n(-CH_2) +$
97 $n(-CH_3))$.

98 **Cultivation and sample preparation**

99 All *Mortierella* species were obtained from the Jena Microbial Resource Collection (JMRC) localized at
100 the Leibniz-Institute for Natural Product Research and Infection Biology Jena. A comprehensive
101 survey of the species used in this study is given in table 2. Fungi were grown on malt extract agar
102 plates (MEA, 2% glucose, 2% malt extract, 0.2% peptone from soy bean, 2% agar) for five days at
103 18°C or 25°C or on glycerine agar plates (GYA, 2% glycerol, 1% yeast extract, 2% agar) for five days at
104 18°C. A small amount of the aerial mycelia was harvested, placed into a droplet of deionized water
105 on top of a fused silica slide and carefully spread in order to singularize but not tear the individual
106 hyphae. The water was removed from the slide as far as possible and the sample dried at room
107 temperature. For GC analysis the remaining aerial mycelium was harvested from the solid agar and
108 stored at -18°C until further use.

109 **Raman spectroscopy**

110 The micro-Raman spectra were measured with a BioParticleExplorer (rapID, Germany) using a
111 frequency-doubled Nd:YAG laser (LCM-S-111-NNP25, Laser-export Co. Ltd., Russia) with an excitation
112 wavelength of 532 nm. The laser was focussed onto the sample by a 100 \times objective (MPlanFL N
113 100 \times 0.90 BD, Olympus, Germany) and an incident laser power of approximately 10 mW was
114 delivered to the sample. The backscattered light was collected by the same objective, Rayleigh light
115 removed by two edge filters and the Raman scattered light then passed through a single stage
116 monochromator (HE532, 920 lines/mm, Horiba Jobin Yvon, Germany). The spectra were recorded
117 with a Peltier-cooled CCD camera (DV 420A-BV, Andor technology, Northern Ireland) from 182 cm^{-1}
118 to 3377 cm^{-1} with a spectral resolution of approximately 8 cm^{-1} . No x axis calibration was performed
119 on the data. Spectra were recorded with a preburning time of 15 s and an acquisition time of 15 s.

120 Gas Chromatography

121 **Lipid extraction and derivatization.** For lipid extraction the method described by Folch (39) was
122 adapted to the small sample volume. Thawed mycelia were treated with 6 mL chloroform:methanol
123 (2:1 v/v) under sonication for 30 min, aqueous sodium chloride solution (2 mL, 2m%) was added and
124 the sample centrifuged at 3750 g for 5 min (Rotina 46, Hettich, Germany). The aqueous phase was
125 discarded, the organic phase dried with sodium sulfate, filtered and the solvent evaporated under
126 nitrogen flux, yielding the crude lipid extract.

127 The extract was redissolved in 2.5 mL n-hexane and treated with sodium methylate solution (0.5 mL,
128 0.5 molar) at room temperature. After shaking for approximately 2 min, the reaction was terminated
129 by adding sodium hydrogen sulfate monohydrate, the reaction mixture shaken again for 2 min and
130 centrifuged (5 min, 3750 g). From the supernatant containing the fatty acid methyl esters (FAMES)
131 the solvent was evaporated under nitrogen stream and the FAMES redissolved in n-hexane to give a
132 1% solution.

133 **GC instrumentation.** The FAMES were analyzed by gas chromatography (GC, GC-17A, Shimadzu,
134 Japan) using a medium polar column (DB 225MS, 60 m × 0.25 mm internal diameter, film thickness
135 0.25 µm, Agilent Technologies, US). Details on the conditions of GC analysis, used FAME standards
136 and peak integration have been reported by Kuhnt et al. and can also be found in the supplementary
137 data (40). Data were analyzed with the LabSolutions software for GC (GCsolution, Shimadzu, Japan).

138 Data processing

139 All calculations on Raman data were performed with Matlab 7.11.0 (R2010b). After removal of
140 cosmic spikes the spectra were reduced to the region of interest, which is 900 – 1800 cm⁻¹. The
141 background was estimated with a linear regression fit (window size 150) for each spectrum and then
142 subtracted. Lorentzian peak profiles were fitted to the two signals at 1270 and 1308 cm⁻¹
143 simultaneously and two Lorentzian profiles were fitted to the signal at 1445 cm⁻¹, their maxima being
144 approximately at 1435 and 1450 cm⁻¹. From the fits the maximum peak intensity is determined and a
145 ratio is calculated to I(1270)/I(1445) with I(1445) = I(1435)+I(1450). Spectra for which obvious peak
146 fitting problems were observed are excluded from further analyses. Usually 15 to 25 spectra were
147 recorded per sample, but for all fungal samples a minimum of ten spectra per replicate were used
148 unless stated otherwise. From all peak intensity ratios per sample the first, second (median) and
149 third quartile were calculated.

150 From the GC results the degree of unsaturation was calculated as follows: For each of the identified
151 FAMES the molar quantity was calculated from their fraction in the mixture. From this molar quantity
152 the number of =CH, -CH₂ and -CH₃ groups of the respective triglyceride was calculated. The sum of

153 the entire number of =CH groups was divided by the sum of all $-CH_2$ and $-CH_3$ groups. Further details
154 on the calculation can be found in the supplementary data.

155 Results and discussion

156 Qualitative evaluation

157 The feasibility to obtain Raman spectra from single lipid vesicles inside intact hyphae has been
158 proven in previous work (38). In figure 1 raw spectra of single lipid vesicles for six representative
159 species are depicted. These spectra are solely normalized to the peak intensity of the signal at
160 1748 cm^{-1} for better visualization and are not processed any further (e.g. baseline correction or
161 smoothing). From this figure it can be seen that lipid spectra from inside intact hyphae have good
162 quality, which is also confirmed by comparing the spectra with single raw spectra of pure reference
163 compounds (spectrum g in figure 1).

164 All of the spectra show several distinct peaks that are typical for lipids. Methylene and methyl groups
165 give rise to prominent signals at $2940\text{--}2870$, 2854 , 1445 and 1308 cm^{-1} , isolated *cis*-double bonds
166 result in signals at 3016 , 1665 and 1270 cm^{-1} , long carbon chains give rise to a signal at 1084 cm^{-1} and
167 the weak signal at 1748 cm^{-1} originates from the ester carbonyl bond. A more detailed assignment of
168 the relevant signals is given in table 3.

169 For spectra of different species variations in the peak intensities are discernible. While for *M. exigua*
170 the signal at 1270 cm^{-1} (from =CH groups) is only half of the intensity of the peak at 1308 cm^{-1} (from
171 --CH_2 groups) its intensity increases from bottom to top until for *M. alpina* its intensity is more than
172 twice the one of the peak at 1308 cm^{-1} . These variations reflect an increase in the number of =CH
173 groups compared to the number of --CH_2 groups and hence an increase in the degree of
174 unsaturation.

175 To quantify this effect we use the signals at 1270 and 1445 cm^{-1} as measure for the amount of =CH
176 groups and the combined amount of both, --CH_2 and --CH_3 groups, respectively. Lorentzian peak
177 profiles are fitted to both signals in order to determine their exact height, with the peak at 1445 cm^{-1}
178 being described by two Lorentzian profiles. From these values, a peak intensity ratio is calculated to
179 $I(=\text{CH})/I(\text{--CH}_2 + \text{--CH}_3)$ for each spectrum. Low peak intensity ratios thus indicate few double bonds
180 and a low degree of unsaturation, whereas high peak intensity ratios represent many double bonds
181 and a high degree of unsaturation.

182 Variations between identical replicates

183 Using these peak intensity ratios we evaluate the measurement results obtained from identical
184 samples in a first step. For this purpose we grew biological duplicates of different species under
185 identical conditions (i. e. the same medium batch, identical inoculation and harvest time point, same
186 growth temperature). From these identical replicates aerial mycelium was harvested from both

187 plates at random positions and Raman microspectroscopy was performed on arbitrarily chosen lipid
188 vesicles. The measurement results are shown in figure 2.

189 For most of the species both median values show only minimal variations and the 1st and 3rd quartile
190 are similarly large.

191 Some values, however, are slightly different from each other. For example replicate A of
192 *M. amoeboides* shows a larger interquartile range than replicate B. Only eight spectra were recorded
193 for this replicate, which renders the statistical values less reliable. This emphasizes the necessity to
194 record a sufficient number of spectra per sample for the values to be representative.

195 For *M. parvispora* and *M. verticillata* replicate A shows a larger interquartile range than replicate B.
196 For both replicates A, Raman spectra from different lipid vesicles were distinctly different from each
197 other, the variations discernible by naked eye already. For *M. verticillata* exemplary Raman spectra
198 of these vesicles are shown in figure S3. This indicates considerable variations in the lipid
199 composition of different vesicles within the sample.

200 Most likely this phenomenon is linked to known lipid composition variations along a hypha (38).
201 From previous work we know, that the lipid composition of vesicles close to hyphal tips can be
202 different from that of older hyphal parts. Usually these variations are rather small. Obvious variations
203 as in the case of *M. parvispora* or *M. verticillata* were observed only rarely and not reproducibly. Still,
204 if sufficient numbers of spectra are recorded, the median value becomes representative of the entire
205 sample again as is apparent from comparing the median values of replicate A and B for both species.
206 Therefore, the known variations within single hyphae are not detrimental to the measurements.

207 For *M. alpina* the median and the interquartile range of both replicates are different from each
208 other. We frequently observed additional signals at 1610, 1593, 1577 and 1164 cm⁻¹ in the spectra,
209 which greatly vary in intensity. Exemplary spectra can be found in figure S4. As we observed no
210 differences in the samples themselves and the signals are very intense, we hypothesize them to be
211 some kind of pigment, that is not permanently present but shows UV-Vis absorption at 532 nm thus
212 giving very strong, resonance enhanced Raman spectra. The spectral range, in which the signals
213 occur, is the typical region of stretching vibrations from conjugated polyenes. In zygomycetes, the
214 fungal group the genus *Mortierella* belongs to, carotenoids and their derivatives are known to be
215 sexual hormones (41, 42). In particular, trisporoids and their precursors can have several functional
216 groups on the cyclohexene ring or C13 position of the isoprenoid side chain (42). Thus, different
217 polyene derivatives can be present in varying concentrations in the fungal hyphae. Also, polyenes are
218 highly soluble in lipids and could accumulate in the lipid vesicles, which in combination with the
219 resonance Raman enhancement would account for their detectability despite their assumably low

220 concentrations. Since three signals of varying intensities occur at 1610, 1593 and 1577 cm^{-1} there
221 seem to be several compounds present in the samples of *M. alpina*. As the peak position of the C=C
222 stretching vibration in polyenes shifts to smaller wavenumbers with increasing number of conjugated
223 double bonds (43, 44) the compounds present in *M. alpina* presumably have 6 conjugated double
224 bonds or less (43-45). Therefore, they are most likely to be trisporoid derivatives.

225 Similar to our work Samek and colleagues found signals of β -carotene in lipid spectra of microalgae
226 (37). They observed that the presence of β -carotene in the lipid influences the IV determination by
227 Raman spectroscopy, since β -carotene contributes to the signal at 1445 cm^{-1} . Using the spectrum of
228 pure β -carotene they were able to quantify its influence on their IV determination. Since we do not
229 know the identity of our polyenes and therefore cannot obtain pure reference spectra, we did not
230 attempt to quantify their effect on the IV. However, the presence of varying amounts of polyenes
231 especially in *M. alpina* may explain the large variations observed for samples of this species.

232 Still, the aerial mycelium can be harvested at random positions from the biological replicates giving
233 representative peak intensity ratios for a sample if a sufficient number of lipid vesicles is measured.
234 Unusual effects in the samples can be identified from the larger than average interquartile range as
235 has been discussed for *M. alpina*, *M. parvispora* and *M. verticillata*.

236 For six representative species (see table 2) Raman measurements were performed repeatedly on at
237 least three independent replicates grown under three different growth conditions: on GYA at 18°C,
238 on MEA at 18°C and on MEA at 25°C. A comparison of the determined median peak intensity ratios
239 for all replicates is shown in figure 3.

240 For all species the samples grown on GYA with glycerol as carbon source are found to have higher
241 peak intensity ratios than the samples grown on MEA with glucose as carbon source. This increase in
242 peak intensity ratio indicates that the fungi produce lipids with higher amount of unsaturated fatty
243 acids when grown on GYA instead of MEA. In a study similar to ours, Sajbidor et al. also used glucose
244 and glycerol as carbon sources for cultivating *M. ramanniana* but found only minor variations in the
245 lipid composition (46). Other reports are inconclusive on the effect of glycerol as carbon source on
246 the total degree of unsaturation, since only a fraction of the fatty acid composition is accounted for
247 (50% to 80%) (13, 47), which prevents the comparison with our results.

248 Samples grown on MEA at 18°C (circles in figure 3) have similar or slightly increased peak intensity
249 ratio and consequently a higher degree of unsaturation than samples grown at 25°C (squares in
250 figure 3). The magnitude of this effect varies for different species, but remains small for most. Only
251 *M. antarctica* shows larger differences in lipid composition for the two temperatures. This increase in

252 the degree of unsaturation upon lowering the growth temperature is in agreement to previous
253 reports that describe an increase in the amount of highly unsaturated fatty acids upon decrease of
254 growth temperature (6, 8, 27, 48).

255 **Quantitative determination**

256 In order to interpret the peak intensity ratios quantitatively, they have to be linked to the number of
257 =CH, -CH₂ and -CH₃ groups in the lipid. To this end we used pure lipid compounds to establish a
258 calibration model. From the known chemical structures of the reference lipids the numbers of =CH,
259 -CH₂ and -CH₃ groups can be determined and a structure ratio $SR = n(=CH)/(n(-CH_2)+n(-CH_3))$ is
260 calculated for each compound (see table 1). Corresponding Raman spectra were recorded, processed
261 identically to the fungal lipid spectra and plotted against the respective SR. A linear function is fitted
262 to the values. The formula $y = -0.049 + 2.259 \cdot SR$ describes the values with an R^2 of 98.63. The
263 resulting calibration plot is shown in figure S5A. Using this calibration function we can now calculate
264 the SR of a sample directly from the peak intensity ratio of its Raman spectrum.

265 To quantify the effect of glucose (MEA) vs. glycerol (GYA) on the degree of unsaturation we
266 calculated the SR for the data of Sajbidor (46) and compare them to our own results. Using their GC
267 results, we get a SR of 0.153 for the sample grown on glucose and a SR of 0.158 for the sample grown
268 on glycerol. Although the SR is higher for the sample grown on glycerol, the difference in SR is only
269 0.005. In our study all tested species have a higher SR than *M. ramanniana* in Sajbidors study.
270 *M. exigua* has the lowest SR of the six species in our study and was therefore chosen for comparison.
271 For *M. exigua* we determined a minimum SR of 0.310 for growth on GYA and a maximum SR of 0.240
272 for growth on MEA (both at 18°C), corresponding to a difference in SR of 0.070. This is more than ten
273 times the variations reported by Sajbidor (46). However, the lipid composition is very diverse for
274 different *Mortierella* species and we did not investigate a sample of *M. ramanniana*. The increased
275 differences in SR upon growth on glycerol in our study may be simply due to the employed species.
276 Also, our media MEA and GYA differ in both, carbon and nitrogen source, which can both alter the
277 lipid composition. Still, we find GYA to be a more suitable medium for generating highly unsaturated
278 lipids.

279 To verify the spectroscopic results with an independent and well established method we extracted
280 the lipids from the entire aerial mycelium of each sample and performed GC analyses on all extracts.
281 From the GC results we calculate the SR of $n(=CH)/(n(-CH_2)+n(-CH_3))$ for each fungal sample (see
282 supplementary information for details). These GC-derived SR are plotted against the Raman-derived
283 SR in figure 4 for samples grown on MEA at 18°C and in figures S2 A and B for samples grown on GYA
284 at 18°C and on MEA at 25°C, respectively.

285 The linear function describing the data has a slope of 0.992 ± 0.022 and intersects the y axis at
286 0.001 ± 0.007 . These values are very close to the ideal line with a slope of 1 going through the origin,
287 which represents perfect correlation. Therefore, the SR determined from the Raman spectra are
288 equivalent to the values determined by GC. Larger deviations are observed for *M. alpina* only, most
289 likely due to the frequent but irregular presence of carotenoids in the corresponding lipid signals.

290 Although the SR is a quantitative measure of the degree of unsaturation, another value is used more
291 frequently throughout lipid analysis, namely the iodine value (IV). The IV is the amount of iodine in
292 gram that can be taken up by 100 g of the analyte. For lipids the iodine uptake is the result of its
293 addition to the double bonds. Hence, high IVs indicate high number of double bonds and
294 consequently high degree of unsaturation. To link the IV to chemical structure information a
295 calibration function has to be generated. Using the Raman reference compounds we calculated their
296 IVs (see supporting information for details) and correlated them to the SR by fitting a second order
297 polynomial to the data (35). The resulting formula $IV = 7 + 625 \cdot SR - 232 \cdot SR^2$ ($R^2 = 99.83$) allows to
298 determine the IV in g/100g for the fungal lipid samples directly from the Raman spectroscopically
299 derived SR. In table 4 the calculated IV as determined by Raman spectroscopy and GC analysis are
300 compared for one replicate of samples grown on MEA at 18°C. A comprehensive survey on all
301 replicates under all growth conditions is given in table S3 and figure S6.

302 The values determined by the two methods show high accordance, differing by a maximum of
303 9 g/100g only. *M. exigua* is found to have very low IVs of about 80 g/100g, which also are the lowest
304 of all species under the tested growth conditions translating to the least PUFAs in their lipid.
305 *M. hyalina* and *M. elongata* have very similar IVs between 95 and 105 g/100g, when grown on MEA,
306 which is slightly higher than that of *M. exigua*. *M. parvispora* and *M. antarctica* have intermediate IVs
307 of approximately 110 and 135 g/100g, respectively. The highest IVs are found for lipids of *M. alpina*,
308 which when grown on GYA at 18°C were found to be as high as 280 g/100g. This is not surprising,
309 since *M. alpina* is frequently reported to contain substantial amounts of arachidonic acid (5, 6, 12,
310 14, 19, 20, 26).

311 Therefore, by Raman spectroscopic determination of the IV results comparable to GC measurements
312 are obtained. However, the spectroscopic determination is faster, requires only very low amount of
313 sample and little to no sample pretreatment. This makes Raman spectroscopy the method of choice
314 for fast screening of fungal oils for specific IVs.

315 **Conclusions and outlook**

316 In this work we were able to show that the quantitative analysis of fungal lipids inside living hyphae is
317 highly feasible. Raman microspectroscopy of single vesicles allows to determine the structure ratio
318 $n(=CH)/n(-CH_2 + -CH_3)$ and the IV from the peak intensity ratios. The results are compared to values
319 obtained by GC, the current standard method for lipid analysis, and are found to be in good
320 concordance. The aerial mycelium can be harvested at arbitrary positions from the culture for
321 representative and reproducible measurement results. Attention has to be paid to measure a
322 sufficient number of vesicles for the data to be reliable. Careful evaluation of the data is necessary if
323 carotenoids are found to be present in the spectra. As their Raman signals overlap with the peaks
324 used for quantification, the resulting values can be misleading. However, this unusual behaviour is
325 easily revealed by the abnormally large median values obtained from such samples.

326 We also found the fungi to contain increased amounts of PUFAs when grown on GYA instead of MEA.
327 Therefore, we conclude that GYA is a more suitable medium for PUFA production than MEA. This is
328 of particular interest since glycerol is available in large amounts as byproduct of biodiesel production
329 and may be converted to valuable compounds by feeding it to *Mortierella* fungi.

330 If the above requirements are met Raman microspectroscopy allows to assess the quality of fungal
331 oils with very little sample handling in a fast and direct manner. This enables rapid screening of
332 known and new samples regarding their lipid-producing potential for various applications and may
333 also help to optimize growth conditions.

334 **Acknowledgment**

335 Financial support from the Jena School for Microbial Communication as well as funding of the
336 research group 'Jenaer Biochip Initiative 2.0' within the framework 'Unternehmen Region –
337 InnoProfile Transfer' from the Federal Ministry of Education and Research, Germany (BMBF, grant
338 number 03IPT513Y) is gratefully acknowledged.

339 **References**

- 340 1. Ratledge, C. 2004. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil
341 production. *Biochimie* **86**: 807-815.
- 342 2. Samek, O., P. Zemánek, A. Jonáš, and H. H. Telle. 2011. Characterization of oil-producing
343 microalgae using Raman spectroscopy. *Laser Phys. Lett.* **8**: 701-709.
- 344 3. Huang, C., X.-f. Chen, L. Xiong, X.-d. Chen, L.-l. Ma, and Y. Chen. 2013. Single cell oil
345 production from low-cost substrates: The possibility and potential of its industrialization. *Biotechnol.*
346 *Adv.* **31**: 129-139.
- 347 4. Meng, X., J. Yang, X. Xu, L. Zhang, Q. Nie, and M. Xian. 2009. Biodiesel production from
348 oleaginous microorganisms. *Renewable Energy* **34**: 1-5.
- 349 5. Dyal, S. D., and S. S. Narine. 2005. Implications for the use of *Mortierella* fungi in the
350 industrial production of essential fatty acids. *Food Res. Int.* **38**: 445-467.
- 351 6. Jang, H.-D., Y.-Y. Lin, and S.-S. Yang. 2005. Effect of culture media and conditions on
352 polyunsaturated fatty acids production by *Mortierella alpina*. *Bioresour. Technol.* **96**: 1633-1644.
- 353 7. Papanikolaou, S., M. Komaitis, and G. Aggelis. 2004. Single cell oil (SCO) production by
354 *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. *Bioresour. Technol.* **95**: 287-291.
- 355 8. Shimizu, S., Y. Shinmen, H. Kawashima, K. Akimoto, and H. Yamada. 1988. Fungal mycelia as a
356 novel source of eicosapentaenoic acid: Activation of enzyme(s) involved in eicosapentaenoic acid
357 production at low temperature. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **150**: 335-341.
- 358 9. Gao, D., J. Zeng, Y. Zheng, X. Yu, and S. Chen. 2013. Microbial lipid production from xylose by
359 *Mortierella isabellina*. *Bioresour. Technol.* **133**: 315-321.
- 360 10. Zeng, J., Y. Zheng, X. Yu, L. Yu, D. Gao, and S. Chen. 2013. Lignocellulosic biomass as a
361 carbohydrate source for lipid production by *Mortierella isabellina*. *Bioresour. Technol.* **128**: 385-391.
- 362 11. Chaudhuri, S., S. Ghosh, D. K. Bhattacharyya, and S. Bandyopadhyay. 1998. Effect of mustard
363 meal on the production of arachidonic acid by *Mortierella elongata* SC-208. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **75**:
364 1053-1055.

- 365 12. Jang, H.-D., Y.-Y. Lin, and S.-S. Yang. 2000. Polyunsaturated fatty acid production with
366 *Mortierella alpina* by solid substrate fermentation. *Bot. Bull. Acad. Sinica* **41**: 41-48.
- 367 13. Hou, C. 2008. Production of arachidonic acid and dihomo- γ -linolenic acid from glycerol by oil-
368 producing filamentous fungi, *Mortierella* in the ARS culture collection. *J. Ind. Microbiol. Biot.* **35**: 501-
369 506.
- 370 14. Dedyukhina, E., T. Chistyakova, and M. Vainshtein. 2011. Biosynthesis of arachidonic acid by
371 micromycetes (review). *Appl. Biochem. Micro.* **47**: 109-117.
- 372 15. Chatzifragkou, A., A. Makri, A. Belka, S. Bellou, M. Mavrou, M. Mastoridou, P. Mystrioti, G.
373 Onjaro, G. Aggelis, and S. Papanikolaou. 2011. Biotechnological conversions of biodiesel derived
374 waste glycerol by yeast and fungal species. *Energy* **36**: 1097-1108.
- 375 16. Voigt, K. 2012. Zygomycota. In Syllabus of Plant Families - A. Engler's Syllabus der
376 Pflanzenfamilien Part 1/1: Blue-green Algae, Myxomycetes and Myxomycete-like organisms,
377 Phytoparasitic protists, Heterotrophic Heterokontobionta and Fungi p.p. W. Frey, editor.
378 Borntraeger, Stuttgart. 130-162.
- 379 17. Ruan, Z., M. Zanotti, X. Wang, C. Ducey, and Y. Liu. 2012. Evaluation of lipid accumulation
380 from lignocellulosic sugars by *Mortierella isabellina* for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* **110**:
381 198-205.
- 382 18. Economou, C. N., A. Makri, G. Aggelis, S. Pavlou, and D. V. Vayenas. 2010. Semi-solid state
383 fermentation of sweet sorghum for the biotechnological production of single cell oil. *Bioresour.*
384 *Technol.* **101**: 1385-1388.
- 385 19. Certik, M., and S. Shimizu. 2000. Kinetic analysis of oil biosynthesis by an arachidonic acid-
386 producing fungus, *Mortierella alpina* 1S-4. *Appl. Microbiol. Biot.* **54**: 224-230.
- 387 20. Ho, S.-Y., Y. Jiang, and F. Chen. 2007. Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs) Content of the
388 Fungus *Mortierella alpina* Isolated from Soil. *J. Agr. Food Chem.* **55**: 3960-3966.

- 389 21. Kenny, F. S., S. E. Pinder, I. O. Ellis, J. M. W. Gee, R. I. Nicholson, R. P. Bryce, and J. F. R.
390 Robertson. 2000. Gamma linolenic acid with tamoxifen as primary therapy in breast cancer. *Int. J.*
391 *Cancer* **85**: 643-648.
- 392 22. Patel, J. V., I. Tracey, E. A. Hughes, and G. Y. H. Lip. 2009. Omega-3 polyunsaturated fatty
393 acids: a necessity for a comprehensive secondary prevention strategy. *Vasc. Health Risk Manage.* **5**:
394 801-810.
- 395 23. Friedman, A. N. 2010. Omega-3 Fatty Acid Supplementation in Advanced Kidney Disease.
396 *Semin. Dialysis* **23**: 396-400.
- 397 24. Gogus, U., and C. Smith. 2010. n-3 Omega fatty acids: a review of current knowledge. *Int. J.*
398 *Food Sci. Tech.* **45**: 417-436.
- 399 25. Kim, W., D. N. McMurray, and R. S. Chapkin. 2010. n-3 Polyunsaturated fatty acids —
400 Physiological relevance of dose. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **82**: 155-158.
- 401 26. Totani, N., and K. Oba. 1987. The filamentous fungus *Mortierella alpina*, high in arachidonic
402 acid. *Lipids* **22**: 1060-1062.
- 403 27. Peng, C., H. Huang, X. Ji, X. Liu, J. You, J. Lu, L. Cong, X. Xu, and P. Ouyang. 2010. A
404 temperature-shift strategy for efficient arachidonic acid fermentation by *Mortierella alpina* in batch
405 culture. *Biochem. Eng. J.* **53**: 92-96.
- 406 28. Lu, J., C. Peng, X.-J. Ji, J. You, L. Cong, P. Ouyang, and H. Huang. 2011. Fermentation
407 Characteristics of *Mortierella alpina* in Response to Different Nitrogen Sources. *Appl. Biochem.*
408 *Biotech.* **164**: 979-990.
- 409 29. Sadeghi-Jorabchi, H., R. H. Wilson, P. S. Belton, J. D. Edwards-Webb, and D. T. Coxon. 1991.
410 Quantitative analysis of oils and fats by Fourier transform Raman spectroscopy. *Spectrochim. Acta A*
411 **47**: 1449-1458.
- 412 30. Weng, Y.-M., R.-H. Weng, C.-Y. Tzeng, and W. Chen. 2003. Structural Analysis of
413 Triacylglycerols and Edible Oils by Near-Infrared Fourier Transform Raman Spectroscopy. *Appl.*
414 *Spectrosc.* **57**: 413-418.

- 415 31. Samyn, P., D. Van Nieuwkerke, G. Schoukens, L. Vonck, D. Stanssens, and H. Van Den
416 Aabbeele. 2012. Quality and Statistical Classification of Brazilian Vegetable Oils Using Mid-Infrared
417 and Raman Spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* **66**: 552-565.
- 418 32. Reitzenstein, S., P. Rösch, M. A. Strehle, D. Berg, M. Baranska, H. Schulz, E. Rudloff, and J.
419 Popp. 2007. Nondestructive analysis of single rapeseeds by means of Raman spectroscopy. *J. Raman*
420 *Spectrosc.* **38**: 301-308.
- 421 33. El-Abassy, R. M., P. J. Eeravuchira, P. Donfack, B. Von Der Kammer, and A. Materny. 2012.
422 Direct Determination of Unsaturation Level of Milk Fat Using Raman Spectroscopy. *Appl. Spectrosc.*
423 **66**: 538-544.
- 424 34. Lyndgaard, L. B., K. M. Sørensen, F. van den Berg, and S. B. Engelsen. 2012. Depth profiling of
425 porcine adipose tissue by Raman spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.* **43**: 482-489.
- 426 35. Samek, O., P. Zemánek, S. Bernatov, Z. Pilát, and H. H. Telle. 2012. Following lipids in the food
427 chain: determination of the iodine value using Raman micro-spectroscopy. *Spectrosc. Eur.* **24**: 22-25.
- 428 36. Afseth, N. K., J. P. Wold, and V. H. Segtnan. 2006. The potential of Raman spectroscopy for
429 characterisation of the fatty acid unsaturation of salmon. *Anal. Chim. Acta* **572**: 85-92.
- 430 37. Samek, O., A. Jonás, Z. Pilát, P. Zemánek, L. Nedbal, J. Tríska, P. Kotas, and M. Trtílek. 2010.
431 Raman Microspectroscopy of Individual Algal Cells: Sensing Unsaturation of Storage Lipids in vivo.
432 *Sensors* **10**: 8635-8651.
- 433 38. Münchberg, U., L. Wagner, E. T. Spielberg, K. Voigt, P. Rösch, and J. Popp. 2013. Spatially
434 resolved investigation of the oil composition in single intact hyphae of *Mortierella* spp. with micro-
435 Raman spectroscopy. *BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1831**: 341-349.
- 436 39. Folch, J., M. Lees, and G. H. Sloane Stanley. 1957. A simple method for the isolation and
437 purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**: 497-509.
- 438 40. Kuhnt, K., C. Degen, A. Jaudszus, and G. Jahreis. 2012. Searching for health beneficial n-3 and
439 n-6 fatty acids in plant seeds. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* **114**: 153-160.

- 440 41. Schimek, C., and J. Wöstemeyer. 2005. Pheromone action in the fungal groups
441 Chytridiomycota, and Zygomycota, and in the Oomycota. *In* The Mycota I: Growth, Differentiation
442 and Sexuality. K. Esser, editor. Springer, Heidelberg.
- 443 42. Gooday, G. W. 1994. Hormones in Mycelial Fungi. *In* Growth, Differentiation and Sexuality. J.
444 H. Wessels and F. Meinhardt, editors. Springer Berlin Heidelberg. 401-411.
- 445 43. Withnall, R., B. Z. Chowdhry, J. Silver, H. G. M. Edwards, and L. F. C. de Oliveira. 2003. Raman
446 spectra of carotenoids in natural products. *Spectrochim. Acta A* **59**: 2207-2212.
- 447 44. Schaffer, H. E., R. R. Chance, R. J. Silbey, K. Knoll, and R. R. Schrock. 1991. Conjugation length
448 dependence of Raman scattering in a series of linear polyenes: Implications for polyacetylene. *J.*
449 *Chem. Phys.* **94**: 4161-4170.
- 450 45. Langkilde, F. W., N.-H. Jensen, and R. Wilbrandt. 1985. Time-resolved resonance Raman
451 spectra of the lowest excited triplet state of all-trans-2,4,6-octatriene, alloocimene and neo-
452 alloocimene. *Chem. Phys. Lett.* **118**: 486-492.
- 453 46. Sajbidor, J., M. Certik, and S. Dobroňová. 1988. Influence of different carbon sources on
454 growth, lipid content and fatty acid composition in four strains belonging to mucorales. *Biotechnol.*
455 *Lett.* **10**: 347-350.
- 456 47. Fakas, S., S. Papanikolaou, A. Batsos, M. Galiotou-Panayotou, A. Mallouchos, and G. Aggelis.
457 2009. Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by
458 *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. *Biomass and Bioenergy* **33**: 573-580.
- 459 48. Shinmen, Y., S. Shimizu, K. Akimoto, H. Kawashima, and H. Yamada. 1989. Production of
460 arachidonic acid by *Mortierella* fungi. *Appl. Microbiol. Biot.* **31**: 11-16.
- 461
462
463

464 **Figure legends**

465 **Figure 1: Raman spectra of single lipid vesicles from *M. alpina* (a), *M. antarctica* (b), *M. elongata***
466 **(d), *M. exigua* (f), *M. hyalina* (e) and *M. parvispora* (c).** The depicted spectra are raw data but for
467 intensity scaling to the signal at 1748 cm^{-1} for better comparison. A single spectrum of pure glyceryl
468 trilinoleate is shown for comparison (g).

469

470 **Figure 2: Peak intensity ratios for duplicate measurements per day for different species.** Replicate A
471 is shown in solid grey circles, replicate B in open black triangles with the bars denoting the 1st and 3rd
472 quartile. Peak intensity ratios are calculated from $I(1270\text{ cm}^{-1})/I(1445\text{ cm}^{-1})$.

473

474 **Figure 3: Peak intensity ratios of six species for growth under different conditions.** Species were
475 grown on GYA at 18°C (triangles), on MEA at 18°C (circles) or at 25°C (squares). *M. parvispora* was
476 not measured on GYA due to poor to no growth on this medium. Median values are marked with
477 symbols, the bars denote the 1st and 3rd quartile, the third quartile being marked in darker colour.
478 Peak intensity ratios are calculated from $I(1270\text{ cm}^{-1})/I(1445\text{ cm}^{-1})$.

479

480 **Figure 4: Comparison of structure ratios determined from GC and from Raman spectroscopy for**
481 **fungal samples grown on MEA at 18°C .** A linear function is fitted to the data with an R^2 of 98.81.
482 Data are shown as for *M. alpina* (\triangleright), *M. antarctica* (\triangle), *M. elongata* (\star), *M. exigua* (\diamond), *M. hyalina*
483 (\circ) and *M. parvispora* (\square). Median values are marked with open symbols, the bars denote the 1st and
484 3rd quartile in grey and black, respectively. Structure ratios represent the ratio of
485 $n(=\text{CH})/(n(-\text{CH}_2) + n(-\text{CH}_3))$.

486

487

488 **Tables**

489 **Table 1: Comprehensive list of reference compounds used for Raman spectroscopy in this study**
 490 **and their properties.** Compounds are sorted by increasing number of carbon atoms and increasing
 491 number of double bonds.

Reference lipid	Sum formula	No. DB	SR	IV in g/100g	Purity
<i>Free fatty acids</i>					
Myristoleic acid	C ₁₄ H ₂₆ O ₂	1	0.182	112	99% (GC)
Palmitoleic acid	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	1	0.154	100	≥99%
Oleic acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	1	0.133	90	99% (GC)
Linoleic acid	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	2	0.308	181	≥99%
Linolenic acid	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	3	0.545	273	99% (GC)
Eicosadienoic acid	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	2	0.267	164	≥98%
Eicosatrienoic acid	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	3	0.462	248	≥99%
Eicosapentaenoic acid	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	5	1.111	420	n.a.
Docosatetraenoic acid	C ₂₂ H ₃₀ O ₂	4	0.615	305	≥98% (GC)
<i>Triglycerides</i>					
Glyceryl trimyristate	C ₄₅ H ₈₆ O ₆	0	0	0	≥99% (GC)
Glyceryl tripalmitate	C ₅₁ H ₉₈ O ₆	0	0	0	≥98%
Glyceryl tripalmitoleate	C ₅₁ H ₉₂ O ₆	3	0.146	95	≥99% (GC)
1,3-Dioleoyl-2- palmitoylglycerol	C ₅₅ H ₁₀₂ O ₆	2	0.085	59	≥99%
1,2-Dilinoleoyl-3-palmitoyl- rac-glycerol	C ₅₅ H ₉₈ O ₆	4	0.186	119	≥95% (TLC)
Glyceryl trioleate	C ₅₇ H ₁₀₄ O ₆	3	0.128	86	≥97% (TLC)
Glyceryl trilinoleate	C ₅₇ H ₉₈ O ₆	6	0.293	173	≥98% (TLC)

Glyceryl trilinolenate	$C_{57}H_{92}O_6$	9	0.514	262	$\geq 98\%$
Glyceryl triarachidonate	$C_{63}H_{98}O_6$	12	0.686	320	min. 98%
Glyceryl trinervonate	$C_{75}H_{140}O_6$	3	0.092	67	approx. 98% (GC)

492

493 **Table 2: Survey of all fungal species used in this work.** The species subjected to GC analysis are
494 highlighted in bold.

Species	Strain number (JMRC)
<i>M. alpina</i>	FSU2698
<i>M. amoeboides</i>	FSU9790
<i>M. antarctica</i>	FSU9792
<i>M. camargensis</i>	FSU9796
<i>M. echinosphaera</i>	FSU9805
<i>M. elongata</i>	FSU9721
<i>M. exigua</i>	FSU9811
<i>M. gamsii</i>	FSU981
<i>M. humilis</i>	FSU10535
<i>M. hyalina</i>	FSU509
<i>M. hypsicladia</i>	FSU9852
<i>M. kuhlmanii</i>	FSU9827
<i>M. paraensis</i>	FSU9835
<i>M. parvispora</i>	FSU835
<i>M. verticillata</i>	FSU9852
<i>M. zychae</i>	FSU9864

495

496

497 **Table 3: Assignment of the main signals in lipid spectra from single vesicles.** Comparing the peak
 498 positions to reported literature values, a systematic shift to higher wavenumbers is observed for our
 499 data, which is due to the lack of x axis calibration.

Wavenumber in cm^{-1}	Assignment ^{a)}	References
3016	$\nu(\text{C-H})$	(29),(31),(33),(36)
2940 – 2870	$\nu(-\text{CH}_2)$ and $\nu(-\text{CH}_3)$	& (31),(33),(36)
2854	$\nu(-\text{CH}_3)$	(31),(33),(36)
1748	$\nu(\text{C=O})$ of esters	(29),(30),(31), (32), (33), (36), (38)
1665	$\nu(\text{C=C})_{\text{cis}}$	(29), (30), (31), (32), (33), (36), (38)
1445	$\delta(\text{C-H})$ scissoring	(29), (30), (31), (32), (33), (36), (38)
1308	$\delta(-\text{CH}_2)$ twisting	(29), (30), (31), (32), (33), (36), (38)
1270	$\delta(\text{C-H})_{\text{in plane}}$ in isolated $\text{C}=\text{C}_{\text{cis}}$	(29), (30), (31), (32), (33), (36), (38)
1081 – 1084	$\nu(\text{C-C})$ in $-(\text{CH}_2)_n-$	(31), (33), (36)

^{a)} ν – stretching vibration, δ – deformation vibration

500

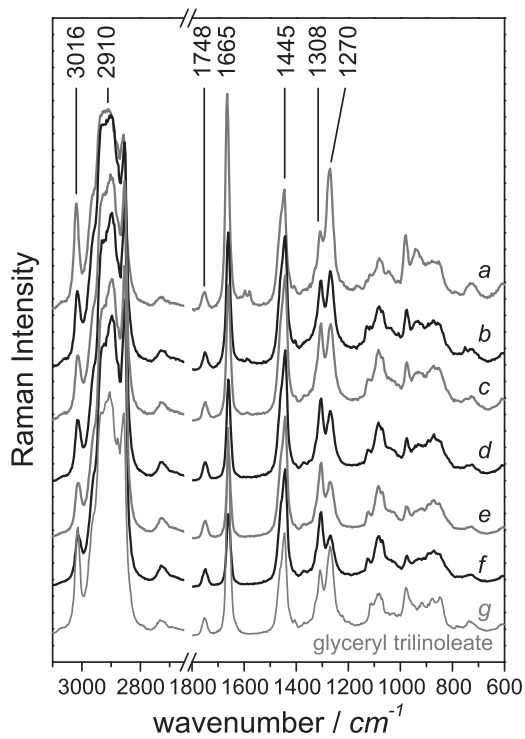
501 **Table 4: Comparison of the IVs determined from Raman and GC.** All values are from the same
502 measurement day for samples grown on MEA at 18°C.

species	IV (Raman)	IV (GC)
	in g/100g	in g/100g
<i>M. alpina</i>	243	248
<i>M. antarctica</i>	147	153
<i>M. elongata</i>	99	102
<i>M. exigua</i>	77	73
<i>M. hyalina</i>	90	93
<i>M. parvispora</i>	116	125

503

504

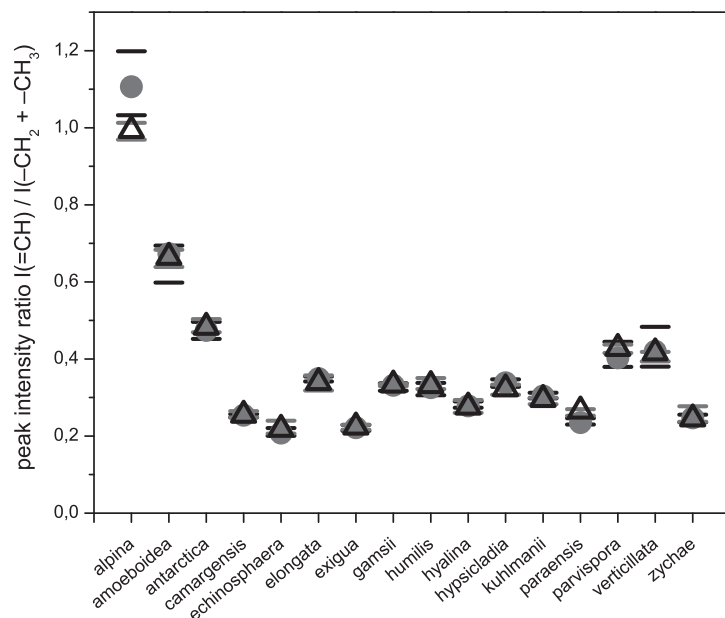
505 **Figure 1**



506

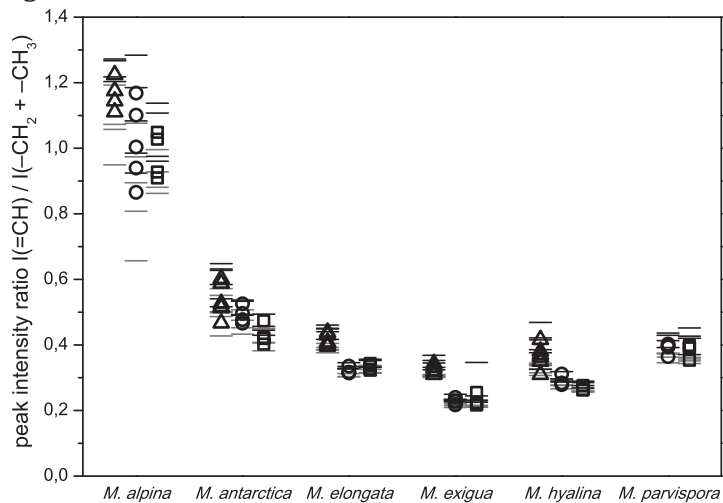
507

508 **Figure 2**



509

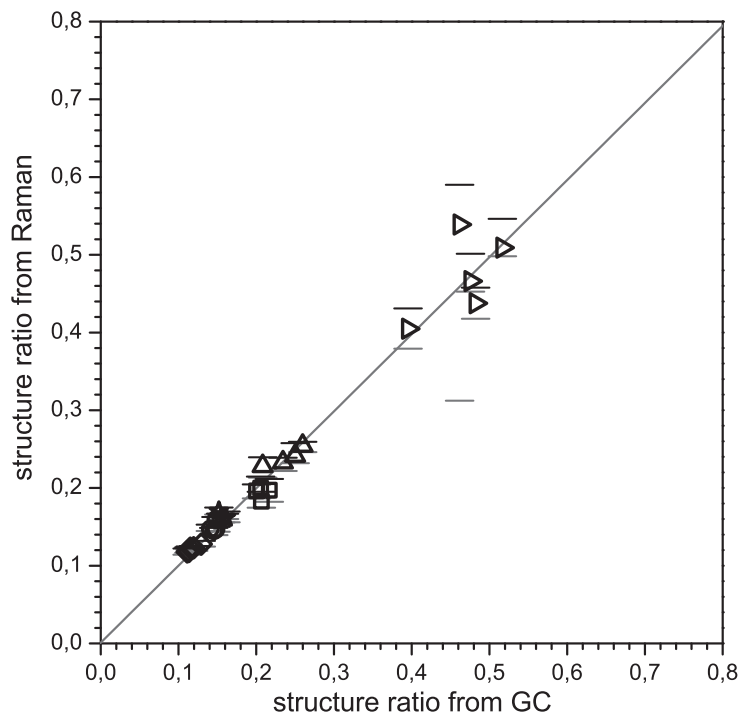
510 **Figure 3**



511

512

513 **Figure 4**



514

Supplementary data to

**Quantitative assessment of the degree of lipid
unsaturation in intact *Mortierella* by Raman
microspectroscopy**

Ute Münchberg^{1,2}, Lysett Wagner^{3,4}, Carsten Rohrer⁵, Kerstin Voigt^{3,4}, Petra
Rösch¹, Gerhard Jahreis⁵, and Jürgen Popp^{1,6}

¹*Institute of Physical Chemistry and Abbe Center of Photonics, Friedrich Schiller
University Jena, Helmholtzweg 4, 07743 Jena, Germany.*

²*Jena School for Microbial Communication, Friedrich Schiller University Jena,
Germany.*

³*Jena Microbial Resource Collection. Institute of Microbiology, Friedrich Schiller
University Jena, Neugasse 25, 07743 Jena, Germany*

⁴*Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology –
Hans-Knöll-Institute, Dept. Molecular and Applied Microbiology,
Adolf-Reichwein-Straße 23, 07745 Jena, Germany.*

⁵*Institute of Nutrition, Friedrich Schiller University Jena, Dornburger Straße 24,
07743 Jena, Germany.*

⁶*Leibniz Institute of Photonic Technology, Albert-Einstein-Straße 9, 07745 Jena,
Germany.*

1 Materials and methods

1.1 Comparison of single lipid vesicles with lipid extract

During Raman measurements only the lipid within a vesicle is investigated. In contrast, for GC analysis the whole sample is extracted including membrane lipids. To evaluate whether the lipid composition of the extract is comparable to that of the vesicles we acquired Raman spectra from both, single vesicles and the crude lipid extract of the same sample for four species. The extract was prepared following the procedure for GC analysis until the lipid is obtained in chloroform solution. This chloroform solution was spotted onto fused silica slides, the chloroform evaporated and Raman measurements were performed on the remaining lipid droplets with the same parameters as for aerial mycelia. The resulting peak intensity ratios for all four species are shown in figure S1. Peak intensity ratios from the lipid extract do not differ from the ratios determined for lipid vesicles in the intact hyphae. We therefore conclude that the extraction of the lipids from the fungi results in a sample with the same composition as found in the single lipid vesicles.

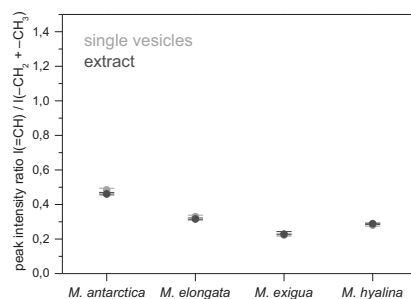


Figure S1: Comparison of peak intensity ratios obtained from single lipid vesicles (green) and lipid extract samples (blue). Median values are marked with circles, the bars denote the 1st and 3rd quartile. Peak intensity ratios are calculated from $I(1270\text{ cm}^{-1})/I(1445\text{ cm}^{-1})$.

1.2 GC instrumentation

GC analysis was carried out using a GC 17A (Shimadzu) equipped with a medium polar column (DB 225MS, 60 m \times 0.25 mm id, film thickness 0.25 μm , Agilent Technologies), an autosampler (AOC 5000, Shimadzu) and a flame ionization detector. The injection

volume was 1.0 μL with a split ratio of 1:20. The carrier gas was H_2 (42.3 cm/s). Injector and detector temperature were kept at 260°C. For the column the initial temperature was kept at 70°C for 2 min, then it was increased by a 10 K/min rate to 180°C, followed by an increase to 220°C with a heating rate of 2.0 K/min. Temperature was kept at 220°C for 5 min, then increased by 2.0 K/min to 230°C, where it was kept for 27 min.

For identification of the FA peaks the following standard FAME mixtures were used: No. 463, 674, (NU-CHEK PREP; INC., US), BR2, BR4, ME 93 (Larodan; Sweden), Supelco37 Component FAME Mix, PUFA No. 3 and conjugated linoleic acid, linoleic-, linolenic and octadecenoic acid methyl ester mix (Supelco, Bellefonte).

1.3 Calculation of the iodine values for reference compounds

The IV s of the reference compounds used for Raman spectroscopy were calculated from their chemical structure. The calculation is carried out exemplarily for arachidonic acid below. The values for all other compounds were calculated accordingly. Using the formula

$$\begin{aligned} m(I_2) &= \text{number of double bonds} \cdot M(I_2) \\ &= 4 \cdot n(\text{arachidonic acid}) \cdot M(I_2) \end{aligned}$$

with

$$n(\text{arachidonic acid}) = \frac{100 \text{ g}}{M(\text{arachidonic acid})}$$

the IV for arachidonic acid calculates to

$$m(I_2) = 4 \cdot \frac{100 \text{ g}}{304.52 \text{ g/mol}} \cdot 253.8 \text{ g/mol} = 333.38 \text{ g/100 g}$$

for arachidonic acid.

1.4 Calculation of the SR and IV from GC results

To compare the Raman spectroscopic results with GC data, we calculated the SR from GC measurements. As the Raman signal at 1445 cm^{-1} contains information on both,

-CH₂ and -CH₃ groups in the sample, we also calculated the amount of -CH₂ and -CH₃ groups from the GC results. For better readability we will only refer to methylene groups in the following description, but the values always include -CH₂ and -CH₃ groups.

For each fatty acid methyl ester (FAME) that was identified by GC the molar mass of the FAME, molar mass of the respective triglyceride (TG) and the number of =CH and methylene groups was calculated from the sum formula of the respective free fatty acid (FA, see table 1).

molar mass of FAME:

$$M_{FAME} = (N_{C,FA} + 1) \cdot M_C + (N_{H,FA} + 2) \cdot M_H + N_{O,FA} \cdot M_O$$

number of =CH groups per molecule FA:

$$N(=CH)_{TG} = 3 \cdot N(=CH)_{FA} = 3 \cdot (2 \cdot N_{C,FA} - N_{H,FA})$$

number of -CH₂ and -CH₃ groups per molecule FA:

$$\begin{aligned} N(-CH_2)_{TG} &= 3 \cdot N(-CH_2)_{FA} + 2 \\ &= 3 \cdot (N_{C,FA} - N(=CH)_{FA} - 1) + 2 \end{aligned}$$

From the GC measurements we calculated for each FAME the molar amounts of =CH and -CH₂ that the respective triglyceride contributes to the entire sample by using the following formulae. Percentages of FAMEs determined by GC were directly taken as masses of FAMEs and the values calculated for 100 g of mixture.

amount of substance of TG:

$$n(TG_i) = \frac{1}{3} n(FAME_i) = \frac{1}{3} \frac{m(FAME_i)}{M_{FAME,i}}$$

amount of substance of =CH groups:

$$n(=CH)_{TG,i} = n(TG_i) \cdot N(=CH)_{TG,i}$$

amount of substance of -CH₂ groups:

$$n(-CH_2)_{TG,i} = n(TG_i) \cdot N(-CH_2)_{TG,i}$$

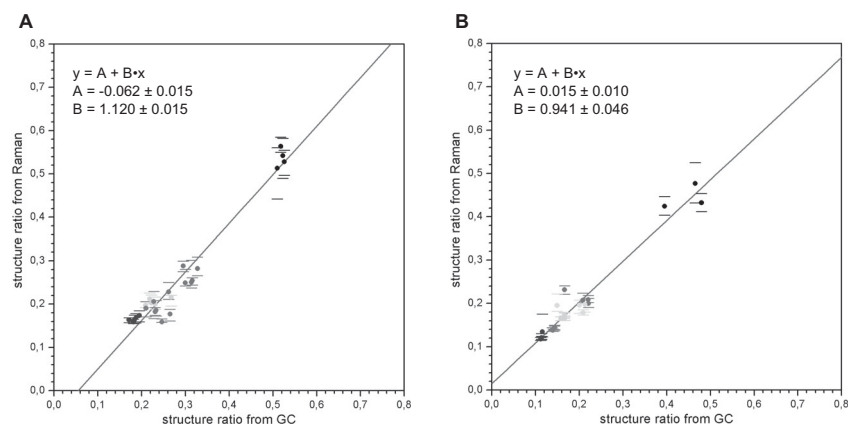


Figure S2: Comparison of structure ratios determined from GC and from Raman spectroscopy. Panel A shows results for fungal samples grown on GYA at 18°C, panel B shows results for fungal samples grown on MEA at 25°C. A linear function is fitted to each data set and shown in grey. R^2 value is 95.17 for samples grown on GYA at 18°C and 94.92 for samples grown on MEA at 25°C. Data of *M. alpina* are shown in black, *M. antarctica* in red, *M. elongata* in green, *M. exigua* in blue, *M. hyalina* in orange and *M. parvispora* in pale blue. The symbols mark the median value for each compound, the bars denote the first and third quartile. Structure ratios represent the ratio of $n(=CH)/(n(-CH_2) + n(-CH_3))$.

Finally, the structure ratio SR for each lipid sample is calculate to

$$SR = \frac{\sum_i n(=CH)_{TG,i}}{\sum_i n(-CH_2)_{TG,i}}$$

The resulting value for each sample can then be used to plot the Raman spectroscopically determined SR against it as shown in figures S2 A and B.

For calculation of the IV from the GC results, for each FAME the amount of iodine was calculated separately and then summarized for all FAMEs. Furthermore, the mass of triglyceride corresponding to the determined amount of each FAME is calculated in order to refer the calculated total amount of iodine to 100 g of the corresponding TG mixture using the following formulae:

mass of iodine per FAME

$$m(I_2)_{FAME,i} = \text{number of double bonds per FA} \cdot n(FAME)_i \cdot M(I_2)$$

molar mass of triglyceride calculated from chemical composition of FA:

$$M_{TG} = (3 \cdot N_{C,FA} + 3) \cdot M_C + (3 \cdot N_{H,FA} + 2) \cdot M_H + (3 \cdot N_{O,FA}) \cdot M_O$$

the mass of TG corresponding to the determined amount of FAME is obtained by

$$\begin{aligned} m(TG_i) &= n(TG_i) \cdot M_{TG,i} \\ n(TG_i) &= \frac{1}{3} n(FAME_i) = \frac{1}{3} \frac{m(FAME_i)}{M_{FAME,i}} \\ IV &= \frac{m(I_2)_{total}}{m(TG)_{total}} = \frac{\sum_i m(I_2)_{FAME,i}}{\sum_i m(TG_i)} \end{aligned}$$

1.5 Reproducibility of GC measurements

To evaluate the reproducibility of the GC analyses, *M. hyalina* was grown on multiple plates of MEA at room temperature until the plates were completely covered with aerial mycelium (10 days). The mycelium from several plates was combined and homogenized. The homogeneous sample was split and both replicates were handled independently (extraction, transesterification, GC measurement). Detailed results from GC analysis of both samples are given in table S1. For each FAME the difference in mass percentage was calculated and the amount of =CH and -CH₂ groups corresponding to this percentage was calculated. The sum values are the errors in determining n(=CH) and n(-CH₂). Since the SR is calculated from

$$SR = n(=CH)/n(-CH_2)$$

its error is obtained by partial differentiation of this equation.

$$\begin{aligned} \Delta(SR) &= \frac{\partial SR}{\partial n(=CH)} \cdot \Delta n(=CH) + \frac{\partial SR}{\partial n(-CH_2)} \cdot \Delta n(-CH_2) \\ &= \frac{1}{n(-CH_2)} \cdot \Delta n(=CH) + \frac{n(=CH)}{n(-CH_2)^2} \cdot \Delta n(-CH_2) \end{aligned}$$

From these measurements, a mean SR of 0.186 ± 0.002 was calculated, which corresponds to an error of 1%. We expect the measurement reproducibility to be the same when the SR is determined for the fungal samples.

2 Supplementary tables

Table S1: GC results for duplicate sample processing. One batch of harvested mycelium from *M. hyalina* was split and both parts treated separately. Fatty acid denotation is as follows: C – number of carbon atoms : number of double bonds, position and isomerism of double bonds.

Replicate	No. 1	No. 2
Fatty acid ^{a)}	[m%]	[m%]
C-4:0	0.00	0.00
C-6:0	0.04	0.05
C-7:0	0.00	0.00
C-8:0	0.00	0.00
C-9:0	0.00	0.00
C-10:0	0.01	0.01
C-10:1	0.00	0.00
C-11:0	0.00	0.00
C-11:1	0.00	0.00
C-12:0	0.15	0.15
C-12:1	0.00	0.00
C-13iso	0.00	0.00
C-13aiso	0.00	0.00
C-13:0	0.04	0.04
C-13:1	0.00	0.00
C-14iso	0.00	0.00
C-14:0	3.20	3.23
C-14:1t9	0.00	0.00
C-14:1c9	0.00	0.00
C-15iso	0.00	0.00
C-15aiso	0.00	0.00
C-15:0	0.18	0.18
C-15:1t10	0.00	0.00
C-15:1c10	0.00	0.00
C-16iso	0.00	0.00
<i>continuing ...</i>		

Fatty acid	Replicate 1	Replicate 2
C-16:0	12.76	12.94
C-16:1t9	0.04	0.04
C-16:1c9	0.18	0.19
C-17iso	0.00	0.00
C-16:2 ω 4	0.00	0.00
C-17aiso	0.00	0.00
C-16:3 ω 4	0.00	0.00
C-17:0	0.19	0.19
C-16:4 ω 1	0.00	0.00
C-17:1t10	0.00	0.00
C-17:1c10	0.00	0.00
C-18iso	0.00	0.00
C-18aiso	0.00	0.00
C-18:0	7.82	7.85
C-18:1t9	0.57	0.56
C-18:1c9	46.24	46.06
C-18:1isomer0	0.00	0.00
C-18:1c11	0.15	0.15
C-18:1isomer1	0.00	0.00
C-18:1isomer2	0.00	0.00
C-18:2t9,t12	0.00	0.00
C-18:1isomer3	0.00	0.00
C-18:2c9,c12	4.56	4.56
γ C-18:3c6,c9,c12	3.98	3.97
C-18:3t3,c9,c12	0.00	0.00
C-19aiso	0.00	0.00
α C-18:3c9,c12,c15	0.20	0.20
C-19:0	0.38	0.38
C-18:4c6,c9,c12,c15	0.00	0.00
C-19:1c7	0.00	0.00
CLA-Z	0.00	0.00
CLA-c9,t11/t8,c10	0.00	0.00
CLA-c11,t13	0.00	0.00
<i>continuing ...</i>		

Fatty acid	Replicate 1	Replicate 2
CLA-t10,c12/c11,t13	0.00	0.00
CLA-t11,c13	0.00	0.00
CLA-c9,c11	0.00	0.00
CLA-cc	0.00	0.00
C-20iso	0.00	0.00
CLA-Y	0.00	0.00
CLA-t11,t13	0.00	0.00
CLA-t9,t11	0.00	0.00
C-20:0	0.28	0.29
C-20:1c5	0.00	0.00
C-20:1c8	0.00	0.00
C-20:1t11	0.00	0.00
C-20:1c11	0.83	0.84
C-20:2c11,c14	0.10	0.10
C-20:3c8,c11,c14	2.02	2.05
C-20:4c5,c8,c11,c14	10.33	10.24
C-20:3c11,c14c17	0.03	0.04
C-21:0	0.00	0.00
C-20:4 ω 3	0.31	0.32
C-20:5 ω 3	2.62	2.57
C-22:0	0.44	0.45
C-22:1c11	0.00	0.00
C-22:1t13	0.00	0.00
C-22:1c13	0.10	0.09
C-22:2c13,c16	0.00	0.00
C-22:4 ω 6	0.00	0.00
C-22:5 ω 6	0.02	0.02
C-22:3 ω 3	0.00	0.00
C-23:0	0.00	0.00
C-22:5 ω 3	0.03	0.03
C-22:6 ω 3	0.00	0.00
C-24:0	0.54	0.55
C-24:1c15	0.70	0.70
<i>continuing ...</i>		

Fatty acid	Replicate 1	Replicate 2
C-25:0	0.00	0.00
C-26:0	0.02	0.03
residue	0.94	0.95
SR	0.187	0.186
error	0.002	0.002

^{a)} 'c' – *cis*; 't' – *trans*; 'iso' – isomeric branched FA; 'aiso' – anisomeric form; 'CLA' – conjugated linolenic acid; ω – first position of double bond counting from methyl end of the chain with the double bonds being *cis* isomers separated by a methylene group.

Table S2: Results of GC measurements for the samples, whose IV is presented in table 4. Fatty acid denotation is as follows: C – number of carbon atoms : number of double bonds, position and isomerism of double bonds. Species are abbreviated as Alp. – *M. alpina*, Arct. – *M. antarctica*, Elon. – *M. elongata*, Exig. – *M. exigua*, Hyal. – *M. hyalina*, Parv. – *M. parvispora*.

Fungal species	Alp.	Arct.	Elon.	Exig.	Hyal.	Parv.
Fatty acid^{a)}	m%	m%	m%	m%	m%	m%
C-4:0	0	0	0	0	0	0
C-6:0	0	0	0	0	0	0
C-7:0	0	0	0	0	0	0
C-8:0	0	0	0	0	0	0
C-9:0	0	0	0	0	0	0
C-10:0	0	0	0	0	0.003	0
C-10:1	0	0	0	0	0	0
C-11:0	0	0	0	0	0	0
C-11:1	0	0	0	0	0	0
C-12:0	0	0.016	0.058	0.072	0.171	0.014
C-12:1	0	0	0	0	0	0
C-13iso	0	0	0	0	0	0
C-13aiso	0	0	0	0	0	0
C-13:0	0	0	0	0	0.018	0.01
C-13:1	0	0	0	0	0	0
C-14iso	0	0	0	0	0	0.044
C-14:0	0.663	0.668	2.191	4.533	3.722	0.762
C-14:1t9	0	0	0	0	0	0
C-14:1c9	0	0	0	0	0	0
C-15iso	0	0	0	0	0	0
C-15aiso	0	0	0	0	0.003	0
C-15:0	0.056	0.147	0.064	0.054	0.089	0.076
C-15:1t10	0	0	0	0	0	0
C-15:1c10	0	0	0	0	0	0
C-16iso	0.033	0.021	0.026	0.006	0.004	0.082
<i>continuing ...</i>						

Fatty acid	Alp.	Arct.	Elon.	Exig.	Hyal.	Parv.
C-16:0	7.237	15.641	14.059	28.361	18.308	9.852
C-16:1t9	0.014	0.018	0.01	0.022	0.028	0.05
C-16:1c9	0.08	0.108	0.232	0.428	0.238	0.227
C-17iso	0	0	0	0	0.001	0.008
C-16:2 ω 4	0	0	0	0	0.003	0.01
C-17aiso	0	0	0	0	0.001	0
C-16:3 ω 4	0	0	0	0	0.002	0
C-17:0	0.069	0.212	0.146	0.06	0.121	0.282
C-16:4 ω 1	0	0	0	0	0	0
C-17:1t10	0	0	0	0	0	0
C-17:1c10	0	0	0	0	0	0
C-18iso	0	0	0	0	0	0
C-18aiso	0	0	0	0	0	0
C-18:0	2.989	7.031	15.414	9.258	8.894	6.76
C-18:1t9	0.085	0.047	0.028	0.031	0	0
C-18:1c9	5.116	21.807	36.179	39.305	46.957	42.932
C-18:1isomer0	0	0	0	0	0	0
C-18:1c11	0.474	0.485	0.244	0.386	0.138	0.381
C-18:1isomer1	0	0	0	0	0.015	0
C-18:1isomer2	0	0	0	0	0	0
C-18:2t9,t12	0	0	0	0	0	0
C-18:1isomer3	0	0	0	0	0	0
C-18:2c9,c12	3.011	3.552	4.064	3.125	3.204	5.627
γ C-18:3c6,c9,c12	4.916	6.508	3.632	2.238	3.803	4.993
C-18:3t3,c9,c12	0.044	0	0	0	0	0
C-19aiso	0	0	0	0	0	0
α C-18:3c9,c12,c15	0	0.02	0.197	0.062	0.182	0.119
C-19:0	0	0	0	0	0	0
C-18:4c6,c9,c12,c15	0.056	0.052	0.425	0.105	0.473	0.443
C-19:1c7	0	0	0	0	0	0
CLA-Z	0	0	0	0	0	0
CLA-c9,t11/t8,c10	0	0	0	0	0	0
CLA-c11,t13	0	0	0	0	0	0
<i>continuing ...</i>						

Fatty acid	Alp.	Arct.	Elon.	Exig.	Hyal.	Parv.
CLA-t10,c12/c11,t13	0	0	0	0	0	0
CLA-t11,c13	0	0	0	0	0	0
CLA-c9,c11	0	0	0	0	0	0
CLA-cc	0	0	0	0	0	0
C-20iso	0	0	0	0	0	0
CLA-Y	0	0	0	0	0	0
CLA-t11,t13	0	0	0	0	0	0
CLA-t9,t11	0	0	0	0	0	0
C-20:0	0.221	0.454	0.484	0.329	0.252	0.416
C-20:1c5	0	0	0	0	0	0
C-20:1c8	0	0	0	0	0.01	0
C-20:1t11	0	0	0	0	0	0
C-20:1c11	0.438	4.882	0.866	0.523	0.558	1.077
C-20:2c11,c14	0.543	0.515	0.225	0.094	0.054	0.191
C-20:3c8,c11,c14	3.308	4.996	5.381	2.922	2.164	4.927
C-20:4c5,c8,c11,c14	64.765	27.38	7.873	5.089	5.78	12.174
C-20:3c11,c14,c17	0	0	0.074	0.006	0.028	0
C-21:0/C-20:4 ω 3	0.05	0.062	0.804	0.155	0.374	0.373
C-20:5 ω 3	0.483	0.381	2.153	0.498	2.019	1.281
C-22:0	0.461	0.614	0.666	0.467	0.317	1.145
C-22:1c11	0	0	0	0	0	0
C-22:1t13	0	0	0	0	0	0
C-22:1c13	0.058	1.026	0.072	0.046	0.062	0.112
C-22:2c13,c16	0.268	0.107	0.126	0.035	0.034	0.276
C-22:4 ω 6	0.076	0.15	0	0.007	0.003	0.027
C-22:5 ω 6	0	0	0	0	0	0.012
C-22:3 ω 3	0	0	0	0	0	0
C-23:0	0	0	0	0	0	0
C-22:5 ω 3	0	0.028	0.033	0.012	0.014	0.112
C-22:6 ω 3	0	0.018	0	0	0.005	0
C-24:0	1.467	0.341	0.675	0.559	0.291	1.305
C-24:1c15	0.761	0.942	1.481	0.458	0.484	0.787
C-25:0	0	0	0	0	0	0

continuing ...

Fatty acid	Alp.	Arct.	Elon.	Exig.	Hyal.	Parv.
C-26:0	0.239	0.019	0.07	0.063	0.028	0.116
residue	2.019	1.751	2.047	0.692	1.142	2.997
SR	0.476	0.260	0.161	0.113	0.145	0.200

^{a)} 'c' – *cis*; 't' – *trans*; 'iso' – isomeric branched FA; 'aiso' – anisomeric form; 'CLA' – conjugated linolenic acid; ω – first position of double bond counting from methyl end of the chain with the double bonds being *cis* isomers separated by a methylene group.

Table S3: Comparison of the IVs for all replicates of fungal samples. For each of the three growth conditions the IVs for all replicates are given as determined by Raman spectroscopy and by GC analysis. IVs are given in g/100g.

Species	Replicate no.	GYA, 18°C		MEA, 18°C		MEA, 25°C	
		Raman	GC	Raman	GC	Raman	GC
<i>M. alpina</i>	1	281	267	243	248	234	244
	2	261	268	228	250	225	250
	3	238	262	180	242	222	215
	4	258	267	211	215	247	261
	5			261	264		
<i>M. antarctica</i>	1	146	180	147	153	124	128
	2	143	179	140	149	124	134
	3	145	172	130	128	118	134
	4	129	154	135	141	134	105
	5	162	169				
	6	157	185				
<i>M. elongata</i>	1	119	134	99	102	102	101
	2	124	132	99	98	108	106
	3	119	126	101	101	102	106
	4	117	138	105	96	105	105
	5	121	156				
<i>M. exigua</i>	1	100	115	77	73	76	72
	2	101	119	79	75	77	73
	3	99	113	82	83	77	74
	4	99	112	78	77	81	75
	5	100	106	76	72		
<i>M. hyalina</i>	1	107	127	90	93	88	90
	2	108	138	97	94	88	89
	3	109	137		96	90	92
	4	105	136	92	95	88	92
<i>continuing ...</i>							

Species	No.	GYA, 18°C		MEA, 18°C		MEA, 25°C	
		Raman	GC	Raman	GC	Raman	GC
	5	100	145	93	90		
	6	102	154				
<i>M. parvispora</i>	1			116	125	112	132
	2			117	128	111	126
	3			114	134	113	95
	4			109	128	109	130

3 Supplementary figures

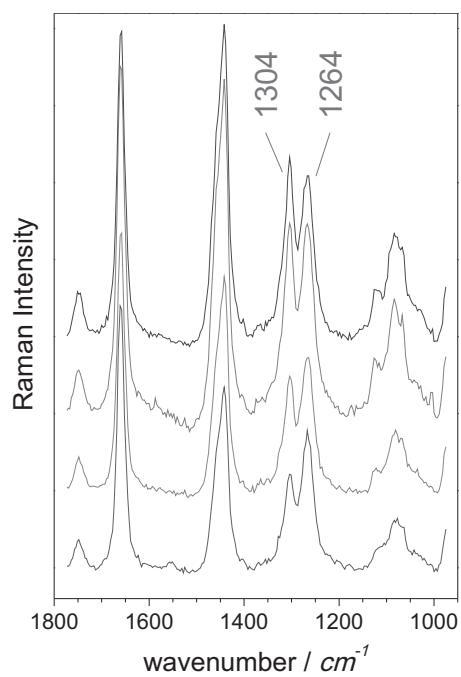


Figure S3: Spectra of single lipid vesicles from replicate A of *M. verticillata*. The four spectra show different peak intensity ratios of the signals at 1264 and 1304 cm^{-1} .

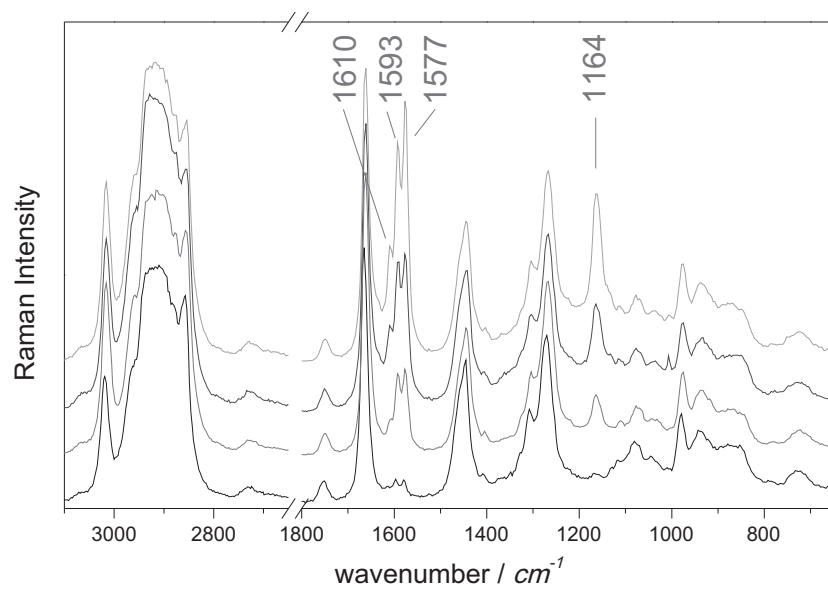


Figure S4: Spectra of single lipid vesicles from *M. alpina* showing additional signals next to the lipid bands. The four spectra show varying intensities of the additional signals at 1610/1593/1577 cm^{-1} and 1164 cm^{-1} indicating different polyene concentrations even though all spectra are obtained from the same sample.

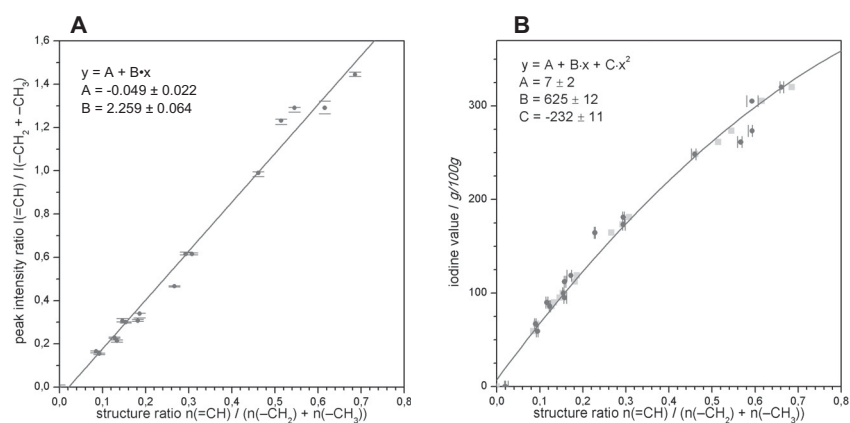


Figure S5: Calibration curves used in this work. In panel A the measured peak intensity ratios of the reference compounds are plotted against their SR in red and the resulting linear function fitted to the data with an R^2 of 98.52 is shown in grey. Panel B shows the correlation of the SR to the IV s for the reference compounds. Calculated SR, to which the second order polynomial is fitted with an R^2 of 99.83, are shown in green. The experimental SR as determined from the peak intensity ratios are shown in red. The symbols mark the median SR for each compound, the bars denote the first and third quartile. Peak intensity ratios are calculated from $I(1270 \text{ cm}^{-1})/I(1445 \text{ cm}^{-1})$.

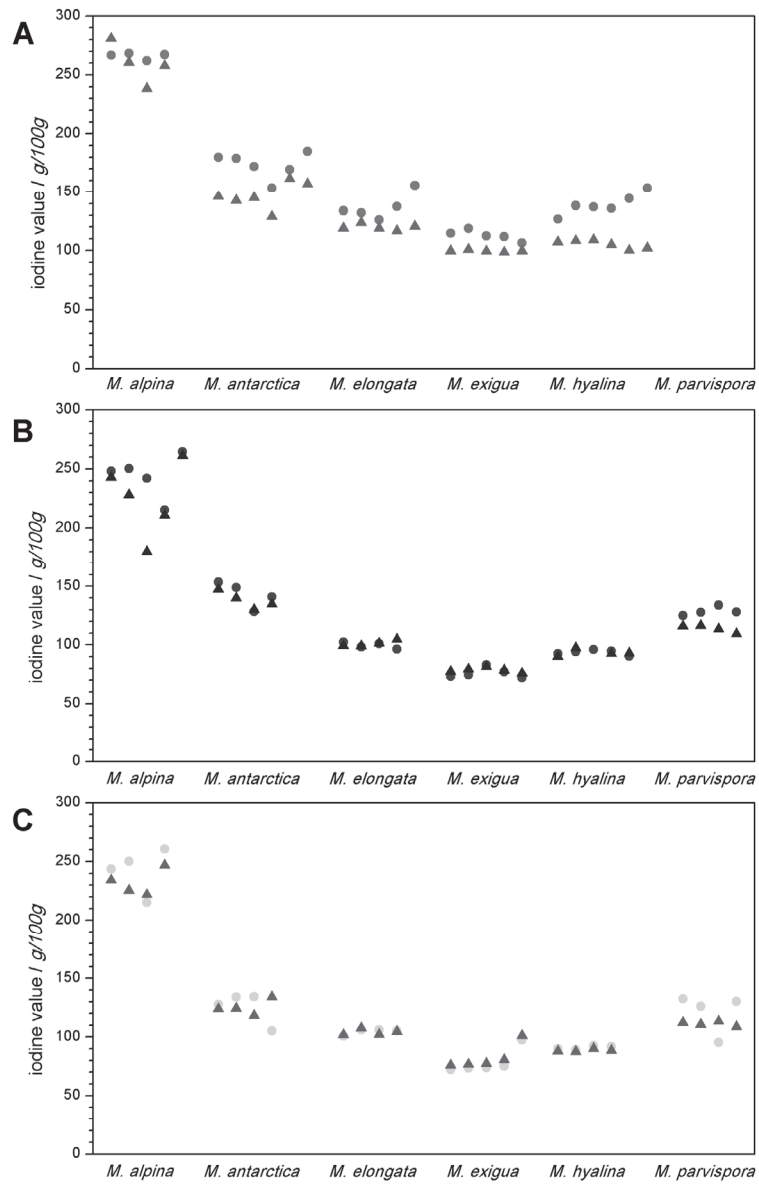


Figure S6 (*preceding page*): Comparison of the IV s for all replicates of fungal samples. Samples grown on GYA at 18°C are shown in red in panel A, samples grown on MEA at 18°C are shown in blue in panel B and samples grown on MEA at 25°C are shown in panel C in green. IVs determined from Raman spectroscopy are depicted as triangles in dark colour, corresponding GC values are shown as circles in bright colour.

Kapitel 3

Publikationen

3.1 Referierte Publikationen

Quantitative assessment of the degree of lipid unsaturation in intact *Mortierella* by Raman microspectroscopy, Ute Münchberg, Lysett Wagner, Carsten Rohrer, Kerstin Voigt, Petra Rösch, Gerhard Jahreis, Jürgen Popp, *Journal of Lipid Research* (submitted), **2014**.

Raman-spectroscopic identification of single bacterial cells under antibiotic influence, Ute Münchberg, Petra Rösch, Michael Bauer, Jürgen Popp, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406, **2014**, pp. 3041-3050.

Spatially resolved investigation of the oil composition in single intact hyphae of *Mortierella* spp. with micro-Raman spectroscopy, Ute Münchberg, Lysett Wagner, Eike T. Spielberg, Kerstin Voigt, Petra Rösch, Jürgen Popp, *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831, **2013**, pp. 341-349.

Crystallization of α - and β -carotene in the foregut of *Spodoptera* larvae feeding on a toxic food plant, Yongqi Shao, Dieter Spitteller, Xiaoshu Tang, Liyan Ping, Claudia Colesie, Ute Münchberg, Stefan Bartram, Bernd Schneider, Burkhard Büdel, Jürgen Popp, David G. Heckel, Wilhelm Boland, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41, **2011**, pp. 273-281.

Polysulfides as biologically active ingredients of garlic, Ute Münchberg, Awais Anwar, Susanne Mecklenburg, Claus Jacob, *Organic and Biomolecular Chemistry*, 5, **2007**, pp. 1505-1518.

3.2 Buchkapitel

IR- and Raman spectroscopy for pathogen detection, Ute Münchberg, Sandra Kloß, Dragana Kusic, Susann Meisel, Ralf Heinke, Stephan Stöckel, Petra Rösch, Jürgen Popp, in *Infectognostics – modern techniques for pathogen detection*, Jürgen Popp, Michael Bauer (Eds.), Wiley-VCH Weinheim, **2014** (in press).

Tracing Bioagents – a Vibrational Spectroscopic Approach for a Fast and Reliable Identification of Bioagents, Petra Rösch, Ute Münchberg, Stephan Stöckel, Jürgen Popp, in *Infrared and Raman Spectroscopy in Forensic Sciences*, John M. Chalmers, Howell G. M. Edwards, Michael D. Hargreaves (Eds.), John Wiley & Sons Ltd., UK, **2012**, pp. 233-250.

3.3 weitere Publikationen

A Raman spectroscopic approach for the cultivation-free identification of microbes, Petra Rösch, Stephan Stöckel, Susann Meisel, Ute Münchberg, Sandra Kloß, Dragana Kusic, Wilm Schumacher, Jürgen Popp, *Proceedings of SPIE (Optical Sensors and Biophotonics III)*, **2011**, pp. 83111B.

Bacterial identification in real samples by means of micro-Raman spectroscopy, Petra Rösch, Stephan Stöckel, Susann Meisel, Anja Bossecker, Ute Münchberg, Sandra Kloß, Wilm Schumacher, Jürgen Popp, *Proceedings of SPIE (Clinical and Biomedical Spectroscopy and Imaging II)*, 8087, **2011**, pp. 808708.

Kapitel 4

Beiträge zu Konferenzen und wissenschaftlichen Symposien

4.1 Vorträge

Identification of Sepsis pathogens with micro-Raman spectroscopy, Ute Münchberg, Petra Rösch, Michael Bauer, Jürgen Popp, *Workshop: Systems Biology of Microbial Infection*, **2011**, Jena, Deutschland.

Countering the threat of sepsis with micro-Raman spectroscopy, Ute Münchberg, Petra Rösch, Michael Bauer, Jürgen Popp, *Scientific Meeting of Photonics for Life*, **2010**, Paris, Frankreich.

Rapid identification of sepsis pathogens with Raman spectroscopy, Ute Münchberg, Wilm Schumacher, Petra Rösch, Michael Bauer, Jürgen Popp, *European Student Conference on Microbial Communication – MiCom*, **2010**, Jena, Deutschland.

4.2 Posterbeiträge

Oil vesicles in *Mortierellales* – Spatial investigation by means of Raman micro-spectroscopy, Ute Münchberg, Lysett Wagner, Kerstin Voigt, Petra Rösch, Jürgen Popp, *Workshop: FTIR Spectroscopy in Microbiological and Medical Diagnostics*, **2011**, Berlin, Deutschland.

Spatial investigation of oil vesicles in *Mortierellales* with micro-Raman spectroscopy, Ute Münchberg, Lysett Wagner, Kerstin Voigt, Petra Rösch, Jürgen Popp, *2nd International Student Conference on Microbial Communication – MiCom*, **2011**, Jena, Deutschland.

Raman Micro-Spectroscopy – A novel method for identification of Sepsis pathogens, Ute Münchberg, Petra Rösch, Michael Bauer, Jürgen Popp, *Sepsis Update*, **2011**, Weimar, Deutschland.

Raman micro-spectroscopy for rapid pathogen identification, Ute Münchberg, Petra Rösch, Michael Bauer, Jürgen Popp, *14th European Conference on*

the Spectroscopy of Biological Molecules (ECSBM), 2011, Coimbra, Portugal.

Identifizierung von Sepsispathogenen mit Mikro-Raman-Spektroskopie,

Ute

Münchberg, Petra Rösch, Michael Bauer, Jürgen Popp, *ANAKON*, 2011, Zürich, Schweiz.

Identification of Fungal Spores with Micro-Raman Spectroscopy, Ute Münch-

berg, Wilm Schumacher, Petra Rösch, Axel Brakhage, Jürgen Popp, *Workshop: Microbes, Models and Methods*, 2010, Jena, Deutschland.

Identification of Sepsis-pathogens with micro-Raman spectroscopy, Ute

Münchberg, Wilm Schumacher, Petra Rösch, Michael Bauer, Jürgen Popp, *SPEC 2010 – Shedding Light on Disease: Optical Diagnosis for the New Millennium*, 2010, Manchester, Großbritannien.

Early detection of pathogenic microorganisms with Raman spectroscopy,

Ute Münchberg, Sandra Kloß, Petra Rösch, Jürgen Popp, *Tagung der DVG-Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie“*, 2010, Jena, Deutschland.

Danksagung

Zum Gelingen einer solchen Arbeit tragen immer viele Menschen bei. Ich möchte mich an dieser Stelle bei den Menschen bedanken, die es mir ermöglicht haben, meine Arbeit erfolgreich durchzuführen.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Jürgen Popp danke ich für das spannende Thema und dafür, dass ich die Promotion in seiner Gruppe durchführen konnte. Die exzellente technische Ausstattung seiner Labore hat es mir erlaubt, meine Fragestellungen mit verschiedenen Methoden anzugehen. Auch möchte ich ihm dafür danken, dass er mir die Teilnahme an zahlreichen Tagungen im In- und Ausland ermöglicht hat.

Besonders danke ich Dr. Petra Rösch für die Betreuung während meiner Arbeit und die vielen produktiven Diskussionen. Sie hatte immer ein offenes Ohr für meine Probleme und hat mir über so manches Tief hinweg geholfen. Prof. Dr. Michael Schmitt danke ich für seine Unterstützung bei fachlichen und organisatorischen Fragen.

Ein Dank geht auch an meinen Zweitbetreuer Prof. Dr. Michael Bauer. Er hat mir als Chemikerin die medizinischen Seiten meiner Arbeit auf spannende Art nahe gebracht.

Bedanken möchte ich mich bei meinen Kooperationspartnern PD Dr. Kerstin Voigt und Lysett Wagner für die gute Zusammenarbeit an unserem Pilz-Projekt sowie bei Prof. Dr. Gerhard Jahreis und Carsten Rohrer für die Arbeit an den GC-Proben.

Der Jena School for Microbial Communication (JSMC) danke ich für das Promotionsstipendium und die tolle Gemeinschaft. Die JSMC-Doktoranden haben durch zahlreiche Events meine Promotionszeit aufgelockert und verschönert. Auch dem BMBF und der Thüringer Aufbaubank (TAB) sei gedankt, die mich im Rahmen der Projekte „Jenaer Biochip Initiative 2.0“ (BMBF) und „FastTB“ (TAB) finanziell unterstützt haben.

Neue Methoden lernt man nur selten allein. Daher danke ich Dr. Thomas Bocklitz, Wilm Schumacher und Bernd Kampe dafür, dass sie mir die Welt der Chemometrie näher gebracht haben und dafür, dass sie mir bei meinen Fragen zu R geholfen haben. Prof. Dr. Rainer Heintzmann danke ich für die geduldige Einführung in und Hilfe mit Matlab.

Ein Dank geht auch an die Schüler und Studenten, die im Rahmen verschiedener Praktika einen Teil des Weges mit mir gemeinsam gegangen sind. Dabei danke ich besonders meiner Diplomandin Sandra Kloß und meinem Bachelor-Studenten Andreas Meißner für die schöne Zeit der Zusammenarbeit. Den technischen Mitarbeitern des IPC sei an dieser Stelle für die gute Zusammenarbeit während Praktikumsbetreuungen gedankt. Sophie Friedrich danke ich für die Unterstützung bei Messzeiten.

Der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für das angenehme Klima, in dem ich

werkeln durfte. Ihr habt dafür gesorgt, dass diese oft anstrengende Zeit trotzdem sehr schön war. Dr. Stephan Stöckel und Ralf Heinke gebührt mein Dank für ihre tatkräftige Hilfe mit den Geräten. Der Mittags-Runde (Anja, Ralf, Susann, Stephan, Sandra, Micha, Sophie, Vali, Anu, Melanie, Sonja, Evelyn, Bernd) vielen Dank für so manchen Zwerchfell-Muskelkater, besonders zum Freitag hin.

Ein besonderer Dank geht an die Kollegen in meinem Büro: Anja Silge, Ralf Heinke, Anne März, Angela Walter und Vinay Kumar. Es hat Spaß gemacht mit euch zusammen. Dir, Anja, ein Extra-Dankeschön für die vielen fachlichen Diskussionen und auch für die anderen.

Für die Korrektur meiner Arbeit danke ich Anja Silge und Dr. Eike T. Spielberg.

Den nötigen Ausgleich zur Arbeit haben mir in dieser Zeit viele Freunde ermöglicht. Julia, Dani, Madeleine, Isa und ganz besonders Peter, danke für die regelmäßige Ablenkung. Dir, Carmen, lieben Dank für die Aufnahme in dein Heim und dafür, dass du mir durch die familienarme Zeit geholfen hast.

Tausend Dank an meine (Schwieger-) Familie für eure uneingeschränkte Unterstützung in dieser oft anstrengenden Zeit. Ein ganz besonderer Dank gilt den beiden wichtigsten Menschen in meinem Leben: meinen beiden Männern. Fabian, du kostest und gibst mir Kraft gleichermaßen. Danke mein Großer! Eike, ohne dich, deine unendliche Geduld und Ermutigungen wäre ich nie so weit gekommen. Danke, dass du immer für mich da bist.

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen angefertigt habe.

.....
Ort, Datum

.....
Ute Münchberg