

**Entwicklung eines
Einweg-Photobioreaktorsystems
zur Hochdurchsatzuntersuchung (Screening)
von Mikroalgen**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Gartenbauwissenschaften
Dr. rer. hort.

genehmigte Dissertation

von

M.Sc. Sebastian Menke

geboren am 09.09.1980, in Rheda-Wiedenbrück

2013

Referent: Prof. Dr. Thomas Rath

Korreferent: Prof. Dr. Bernhard Huchzermeyer

Tag der Promotion: 20.11.2012

Für meine kleine Familie

Kurzbeschreibung

Die Entwicklung von biotechnologischen Prozessen und die Optimierung der Kulturführung erfordert ein ausgedehntes, oftmals teures Screening von neuen Organismen und Kulturparametern. Bei photosynthetisch aktiven Organismen wie beispielsweise Mikroalgen können keine herkömmlichen Screeningsysteme wie beispielsweise Mikrotiterplatten eingesetzt werden. Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Photobioreaktorsystems aus Einwegmaterialien für die Kultur von Mikroalgen. Das zu entwickelnde System sollte einen hohen Probendurchsatz bei möglichst hoher Reproduzierbarkeit gewährleisten.

Das Einweg-Photobioreaktorsystem besteht aus einer Bioreaktormatte und einem Sensorsystem. Die Bioreaktormatten bestehen aus lichtdurchlässigem Polyethylen (PE) mit einer Innenbeschichtung aus Ethylenvinylacetat (EVA) mit 25 identisch verschweißten Reaktorröhren (100 mL). Die Bestimmung der Biomasse erfolgt über ein optisches Sensorsystem, welches automatisch an den einzelnen Röhren geführt wird und Extinktionspektren (Ocean Optics) der Algensuspension im Bereich zwischen 300 bis 800 nm bestimmt. Weiterhin beinhaltet das Sensorsystem ein Chlorophyll Fluorometer (Mini PAM, Heinz Walz GmbH), mit dem die photosynthetische Aktivität der Algen ermittelt wird. Mit Hilfe einer Vorrichtung für die exakte automatische Positionierung von Spektrometer und Chlorophyll-Fluorometer können Analysen in Echtzeit realisiert werden. Die Funktionalität des Screeningsystems wurde anhand von ausgewählten Experimenten aus den Bereichen Toleranzuntersuchungen von Mikroalgen gegenüber salinen Habitaten, Stoffstromanalysen in Mikroalgensuspensionen bei Nitrat- und Phosphatverlagerungen und Phäno- und Genotypisierung einer unbekanntes Algenspezies durchgeführt. Die Ergebnisse der Vergleichs- sowie Funktionalitätsuntersuchungen zeigten, dass das entwickelte Screeningsystem eine Alternative bei Hochdurchsatzuntersuchungen im Mikroalgenbereich ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Kultivierung von Mikroalgen möglich, sowie ein reproduzierbar arbeitendes Sensorsystem vorhanden ist.

Schlagerworte: Mikroalgen, Hochdurchsatz-Screening-System, Einweg-Photobioreaktor

A successful algal biotechnology mainly depends on screening and choosing the adequate algae with desired characteristics along with the design of optimal culture conditions like temperature range, light intensity, airflow and different growth media. Thus, screening can be performed with comparable photo bioreactor technique. For a lot of applications the growth medium is determined and demands designation of the most suitable algae for this specific medium. For maximizing industrial microalgae productivity optimization of high-density cell cultivation conditions is important and culture conditions for maximal growth are certified by screening experiments. To reduce the optimization process a screening method, that determines optimized values with a limited number of experiments, is highly desirable.

For screening experiments an airlift type screening rack was developed. Each rack consisted of 25 identical air bags (100 mL) welded to each other. They are composed of polyethylene with an inside ethylene vinyl acetate-coating. These bags allowed testing of 25 different growth media compositions in a minimum of space under identical culture conditions, like temperature and light intensity. Airflow was put into effect by injected tubes inside the bags connected via valves to a conventional air pumping system. Airflow through the tubes was balanced by airflow valves. The determination of the biomass with an optical sensor system runs automatically at each probe and determined absorbance spectra (Ocean Optics) of algal suspension in the range between 300 to 800 nm. Furthermore, the sensor system includes a chlorophyll fluorometer (Junior-PAM, Heinz Walz GmbH). Herewith the photosynthetic activity of microalgae is determined. With the help of a device for precise automatic positioning of spectrometer and chlorophyll-fluorometer analysis can be realized in real time.

The functionality of the screening system was carried out using selected experiments from the areas of tolerance studies of microalgae in saline habitats, analysis of nutrient flow of microalgae suspension and pheno- and genotyping of an unknown algae species.

The results of the comparison as well as functionality tests showed that the developed screening system is an alternative for high-throughput studies in the field of microalgae. Furthermore, it was shown that a cultivation of microalgae is possible, as well a reproducible sensor-working system is available.

Keywords: microalgae, high throughput screeningsystem, disposable photobioreactor

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	11
1 Einleitung	14
2 Stand des Wissens	16
2.1 Mikroalgen	16
2.1.1 Taxonomie und Physiologie	16
2.1.1.1 Allgemeines	16
2.1.1.2 Photosynthese	17
2.1.1.3 Vermehrung und Wachstum	19
2.1.1.4 Stoffaufnahme und zelluläre Transportmechanismen . .	21
2.1.2 Stoffliche und energetische Nutzung	21
2.2 Bioreaktoren	22
2.2.1 Allgemeines	22
2.2.2 Open-Pond-Systeme	24
2.2.3 Rührreaktor-Systeme	24
2.2.4 Airliftreaktor-Systeme	25
2.2.5 Schüttelreaktor-Systeme	27
2.2.6 Photobioreaktor-Systeme	28
2.2.7 Einweg-Photobioreaktoren	31
2.3 Hochdurchsatzuntersuchungen (Screening)	33
2.3.1 Definition	33
2.3.2 Analysemöglichkeiten	33
2.3.3 Einsatzgebiete	34
2.4 Optische Online-Analytik	35
2.4.1 Definition Online-Analytik	35
2.4.2 Kopplung von Sensoren und Bioreaktoren	35

2.4.3	Optische Messverfahren	36
2.4.4	Sensorsysteme	39
2.4.4.1	Allgemeines	39
2.4.4.2	„in-situ“-Sensorsysteme	41
2.4.4.3	„ex-situ“-Sensorsysteme	41
3	Zielsetzung	42
4	Material und Methoden	43
4.1	Entwicklung eines Screeningsystem-Prototyps	43
4.1.1	Photobioreaktor-Prototyp	43
4.1.1.1	Allgemeiner Aufbau Standardreaktor	43
4.1.1.2	Allgemeiner Aufbau Wippreaktor	44
4.1.1.3	Material der Bioreaktormatte	45
4.1.1.4	Heiz- und Kühlaggregat	45
4.1.1.5	Belichtung	45
4.1.2	Sensorik	47
4.1.2.1	Eingesetzte Sensoren	47
4.1.2.2	Sensorschiene der Sensorik	47
4.1.2.3	Steuerung und Regelung der Sensorik	48
4.2	Systemvergleich	49
4.2.1	Allgemeines	49
4.2.2	Algenspezies	50
4.2.3	Kulturmedien	50
4.2.4	Transmissionsmessungen	51
4.2.5	Berechnung der Wachstumsraten	51
4.3	Systemvalidierung anhand von Screeningbeispielen	52
4.3.1	Einführung und Allgemeines	52
4.3.2	Toleranzuntersuchungen von Mikroalgen gegenüber salinen Ha- bitaten	52
4.3.2.1	Einführung und Allgemeines	52
4.3.2.2	Algenspezies	53
4.3.2.3	Kulturmedium	55
4.3.2.4	Salzanalytik	57
4.3.2.5	Datenanalyse	57

4.3.2.6	Durchführung der Experimente	58
4.3.3	Stoffstromanalysen in Mikroalgensuspensionen bei Nitrat- und Phosphatverlagerungen	59
4.3.3.1	Einführung und Allgemeines	59
4.3.3.2	Algenspezies und Kulturmedium	61
4.3.3.3	Phosphatanalyse	61
4.3.3.4	Nitratanalyse	62
4.3.3.5	Chlorophyll-Fluoreszenzmessung	63
4.3.3.6	Datenanalyse	63
4.3.4	Phäno- und Genotypisierung einer unbekanntes Algenspezies	65
4.3.4.1	Einführung und Allgemeines	65
4.3.4.2	Wachstumsuntersuchungen	67
4.3.4.3	Mikroskopische Untersuchungen	67
4.3.4.4	DNA-Extraktion und PCR mit Agarosegelelektrophorese	68
4.3.4.5	Sequenzierung	69
4.3.4.6	Datenanalyse	70
5	Ergebnisse	71
5.1	Entwicklung des Screeningsystem-Prototyps	71
5.1.1	Photobioreaktor-Prototyp	71
5.1.1.1	Systemaufbau Standardreaktor	71
5.1.1.2	Systemaufbau Wippreaktor	71
5.1.1.3	Systemeigenschaften Reaktormatten	71
5.1.1.4	Begasung und Durchmischung	73
5.1.1.5	Systemvergleich (Wachstum)	75
5.1.2	Sensorik	76
5.1.2.1	Aufbau und Funktionsweise	76
5.1.2.2	Extinktionsmessungen	79
5.1.2.3	Chlorophyll-Fluoreszenzmessung	81
5.2	Systemvalidierung anhand von Screeningbeispielen	82
5.2.1	Toleranzuntersuchungen von Mikroalgen gegenüber salinen Ha- bitaten	82
5.2.1.1	Einsatz des Screeningsystems	82

5.2.1.2	Wachstum und Überlebensraten der Salzschock- und Aufsalzungsexperimente	82
5.2.1.3	Wachstum und Überlebensrate in Aufsalzungsexperimenten	86
5.2.2	Stoffstromanalysen (Nitrat und Phosphat) in Abwasser-Algensuspensionen	87
5.2.2.1	Einsatz des Screeningsystems in den Untersuchungen .	87
5.2.2.2	Wachstum und Vitalität	88
5.2.2.3	Stoffströme von Nitrat und Phosphat	89
5.2.2.4	Extinktionsmessung zur Bestimmung der Stoffströme von Nitrat und Phosphat	93
5.2.3	Phäno- und Genotypisierung unbekannter Algenspezies	95
5.2.3.1	Einsatz des Screeningsystems bei Mikroalgen mit Flagellen	95
5.2.3.2	Wachstum	95
5.2.3.3	Phänotypisierung	96
5.2.3.4	Genotypisierung	96
6	Diskussion	102
6.1	Entwicklung des Screeningsystem-Prototyps	102
6.1.1	Photobioreaktor-Prototyp	102
6.1.1.1	Systemeigenschaften	102
6.1.1.2	Wachstum	104
6.1.1.3	Begasung und Durchmischung	105
6.1.1.4	Belichtung	107
6.1.2	Sensorik-Prototyp	108
6.1.2.1	Aufbau	108
6.1.2.2	Funktionsweise	109
6.2	Systemvalidierung anhand von Screeningbeispielen	109
6.2.1	Toleranzuntersuchungen	109
6.2.1.1	Funktionalität des Screening-Systems bei Toleranzuntersuchungen	109
6.2.1.2	Toleranzuntersuchungen von Mikroalgen gegenüber salinen Habitaten	111

6.2.2	Stoffstromanalyse	112
6.2.2.1	Funktionalität des Screening-Systems bei Stoffstromanalysen	112
6.2.2.2	Stoffstromanalyse der Nitrat- und Phosphatverlagerung in Algensuspensionen	114
6.2.3	Phäno- und Genotypisierung	116
6.2.3.1	Funktionalität des Screening-Systems bei Phäno- und Genotypisierungen	116
6.2.3.2	Phäno- und Genotypisierung einer unbekanntes Algen-spezies	117
7	Schlussfolgerungen	120
8	Ausblick	121
	Literaturverzeichnis	123
9	Anhang	138
9.1	Genotypisierung	138
9.2	R-Code für die Vorhersage der Nährstoffgehalte	139

Abkürzungsverzeichnis

ADP Adenosindiphosphat

ATP Adenosintriphosphat

BGT Fachgebiet Biosystem- und Gartenbautechnik

BLAST Basic Local Alignment Search Tool

bp Basenpaare

CO₂ Kohlendioxid

CSB Chemischer Sauerstoffbedarf

DNA Desoxyribonukleinsäure

DDE Dynamic Data Exchange

EBA European Bioinformatics Institute

ELISA Enzyme-linked Immunosorbent Assay

ETS External transcribed spacer

EVA Ethylenvinylacetat

F₀ Grundlevel der Chlorophyll Fluoreszenz [-]

F_m maximale Chlorophyll Fluoreszenz [-]

F_v variable Chlorophyll Fluoreszenz [-]

FPM Flammenphotometer

H Wasserstoff

H₂O Wasser

HTS High throughput screening

ICP OES Inductively coupled plasma optical emission spectrometry

IR Infrarot

ITS Internal transcribed spacer

K	Kelvin
KCl	Kaliumchlorid
LED	Leuchtdiode
MgCl₂	Magnesiumchlorid
N	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, reduziert
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NH₄	Ammonium
NIR	Nah-Infrarot
NO₃	Nitrat
NTC	Negative Temperature Coefficient Thermistors
NTS	Non-transcribed spacer
OSC	Orthogonal signal correction
P_i	Phosphat
PE	Polyethylen
PAM	Puls-Amplituden-Modulation
PCA	Hauptkomponentenanalyse
PCR	Polymerasekettenreaktion
PLS	Partial Least Squares
PLSR	Partial Least Squares Regression
PPFD	Photosynthetische Photonenflussdichte [$\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$]
PS I	Photosystem I
PS II	Photosystem II
rDNA	Ribosomale Desoxyribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
S_n	Singulettzustand
t₀ - t	Zeitpunkt [<i>d</i>]

T_n Tripletzustand

UV Ultraviolett

VIS sichtbares Licht

X_t Zellzahl Zellen [ml^{-1}]

1 Einleitung

Ein wichtiger Bestandteil jedes biotechnologischen Prozesses ist ein Bioreaktor. Bioreaktoren existieren in verschiedenen Bauformen und Größen, um mit den Anforderungen verschiedener Prozesse oder Organismen zu harmonisieren. Bioreaktoren sind aus diesem Grund nicht nur in der wissenschaftlichen Forschung sondern auch bei industriellen Anwendungen in Gebrauch. Photobioreaktoren sind Bioreaktoren für photosynthetisch aktive Organismen. Die Besonderheit gegenüber klassischen Bioreaktoren ist, dass Photobioreaktoren Lichtquellen besitzen, damit die in ihnen vermehrten Organismen Photosynthese betreiben können.

Ein Beispiel für einen photosynthetisch aktiven Organismus sind Mikroalgen. Mikroalgen haben das Potential, produktiv und effizient Biomasse aufzubauen. Sie sind photosynthetisch autotrophe Organismen und haben bei der Erzeugung von Biomasse eine höhere Photosyntheseleistung als konventionelle Landpflanzen. Die Lichtausbeute in der Primärreaktion, bis zur Synthese von Zuckern, ist bei Mikroalgen und konventionellen Landpflanzen vergleichbar (Raven et al., 2000). Unterschiede ergeben sich durch Schutzreaktionen gegen einen Lichtüberschuss und durch die Notwendigkeit eines Stützgewebes bei konventionellen Landpflanzen. Ein weiterer Vorteil von Mikroalgen ist, dass diese nicht mit der klassischen Lebensmittelproduktion um Ackerflächen konkurrieren (Raja et al., 2008). Mikroalgenbiomasse kann vielfältig verwendet werden, wie zum Beispiel als Nahrungsmittel, als Nahrungsergänzungsmittel, zur Gewinnung von Pharmazeutika, zur Abwasserreinigung, als Quellen für Bioenergie, Feinchemikalien oder Hormone (Becker, 1994; Munoz and Guieysse, 2006). Eine Übersicht über Mikroalgen, welche zur Zeit industriell verwendet werden ist in der Literatur vorhanden (Raja et al., 2008; Hu et al., 2008). Von den bekannten 25000 - 50000 Spezies sind derzeit nur 15 Spezies in einer industriellen Nutzung, in der Regel im Bereich der Biotechnologie. Grund hierfür sind die fehlenden Kenntnisse zu den Einsatzpotentialen, Inhaltsstoffen, und optimalen Kulturführungsstrategien.

Eine innovative Algenbiotechnologie kann somit nur durchgeführt werden, wenn für spezifische Anwendungsmöglichkeiten die jeweils bestmögliche Mikroalge bekannt ist. Ein Screening, welches auf potentielle Algenkandidaten, auf notwendige Kultivierungsverfahren und auf die Reaktion der Algenbiomasse auf Stressfaktoren fokussiert, ist unumgänglich. Dabei spielen Sterilität, hoher Probendurchsatz, Reproduzierbarkeit und geringe Kosten, bei gleichzeitig nahezu anwendungsorientiertem Größenmaßstab, die zentrale Rolle. Bisher ist ein derartiges Screening von Mikroalgen aufgrund der fehlenden Bioreaktoren nicht etabliert, gleichzeitig aber in nahezu allen Applikationen notwendig (Eriksen, 2008; Ugwu et al., 2008).

2 Stand des Wissens

2.1 Mikroalgen

2.1.1 Taxonomie und Physiologie

2.1.1.1 Allgemeines

Mikroalgen sind pro- oder eukaryotische Mikroorganismen. Sie sind entweder einzellig oder weisen einfache mehrzellige Strukturen auf, mit deren Hilfe sie auch unter extremen Bedingungen leben können (Mata et al., 2010). Beispielsweise sind Cyanobakterien (Cyanophyceae) als prokaryotische Mikroorganismen und Grünalgen (Chlorophyta) als eukaryotische Mikroalgen zu nennen (Richmond, 2004). Mikroalgen sind photosynthetisch autotrophe Organismen (Metting, 1996) und kommen in allen wässrigen Habitaten vor: von Süß- über Brack- bis hin zu marinen und hypersalinen Gewässern (Falkowski and Raven, 2007). Es wird davon ausgegangen, dass mehr als 25000 Arten weltweit existieren, von denen aber bisher nur eine kleine Anzahl bekannt ist (Richmond, 2004; Hu et al., 2008). Mittels Photosynthese wandeln sie Lichtenergie in chemische Energie um und nutzen diese für ihren Wachstumszyklus, welcher nach wenigen Tagen durchlaufen ist. Durch ihre Anspruchslosigkeit wachsen Mikroalgen unter einfachsten Bedingungen. Verbessern sich die Umweltbedingungen zum Beispiel hinsichtlich spezifischer Nährstoffe oder zusätzlicher Kohlendioxid-Begasung, so sind sie in der Lage, ihre Wachstumsrate erheblich zu steigern. Mikroalgen haben das Potential, als photoautotrophe Mikroorganismen alternativer Wertstofflieferant zu werden. Beispiele hierfür sind: Biodiesel, mehrfach ungesättigte Fettsäuren, Vitamine, Toxine und Antibiotika (Sheehan et al., 1998; Durmaz et al., 2007). Da Mikroalgen viele Eigenschaften haben, die kommerzielle und technische Vorteile mit sich bringen, ist es wichtig, sich ein besseres Wissen über die vielfältigen Kulturansprüche individueller Arten anzueignen.

2.1.1.2 Photosynthese

Wie schon im vorhergehenden Abschnitt erläutert, ist die Photosynthese ein bestimmendes Merkmal vieler Algenarten. Im Folgenden wird ein genereller Überblick zur Photosynthese und ein detaillierter Einblick in die Photosynthese der Mikroalgen angeführt. Photosynthese ist der Prozess, welcher Lichtenergie in Form von Photonen für die Produktion von organischen Bestandteilen als zelluläre Bausteine und als Energiereserven nutzbar macht.

In der ersten Phase der Sauerstoff produzierenden Photosynthese, bekannt als Lichtreaktion, wird die vom Chlorophyll a der Reaktionszentren aufgenommene Lichtenergie in ATP und NADPH umgewandelt. Diese Prozesse finden Proteinkomplexen der Thylakoidmembran statt. Am Photosystem II (PS II) findet dabei die Reaktionsfolge der Wasserspaltung statt, bei der molekularer Sauerstoff freigesetzt wird. Als Nebenprodukt der Photosynthese diffundiert dieser größtenteils aus der Zelle. Die Absorption eines Lichtquants überführt ein Chlorophyll-a-Molekül im Reaktionszentrum der Photosynthese in einen angeregten Zustand. Dieser Zustand zeichnet sich durch ein negatives Redox-Potential aus. Aus diesem Zustand wird ein Elektron in die photosynthetische Elektronentransportkette übergeben. An dem Ende der Kette entsteht das Coenzym NADPH. Hierdurch liegt ein Teil der absorbierten Lichtenergie in Form des Redox-Potentials von NADPH vor. Während des photosynthetischen Elektronentransportes werden Protonen über die Thylakoidmembran in die Thylakoidvesikel überführt. Hierdurch wird ein pH-Gradient aufgebaut. Dieser Gradient enthält einen weiteren Teil der absorbierten Energie, welcher in einer Folgereaktion von der ATPase der Thylakoidmembran genutzt wird, um ATP zu synthetisieren. Die primären Reaktionen der Photosynthese legen die absorbierte Lichtenergie vorübergehend in Form von Redox-Energie des NADPH und Hydrolyse-Energie des ATP fest. Im Calvin Zyklus werden diese beiden Coenzyme zur Fixierung von Kohlendioxid verbraucht. Hierdurch stehen sie als NADP^+ und ADP den Chloroplasten wieder zur Aufnahme von Energie zur Verfügung (Raven et al., 2000).

Die Photosynthese von Mikroalgen im aquatischen Lebensraum bringt Herausforderungen mit sich, wie beispielsweise die Toleranz gegenüber variierenden Lichtbedingungen und die Fixierung von Kohlendioxid in sauerstoffreichen Lebensräumen (Raven et al., 2000).

Im Vergleich zu Landpflanzen steht den Mikroalgen wiederum nur ein Teil des an der Erdoberfläche ankommenden Spektrums des Sonnenlichts zur Verfügung. Manche Wel-

lenlängen werden vom Wasser und von im Wasser gelösten Stoffen absorbiert. Algen, ausschließlich Flagellaten, lösen dieses Problem, indem sie sich durch die Benutzung eines Photorezeptors in optimale Lichtumgebungen bewegen (Phototaxis). Ein weiterer Lösungsweg der Algen ist die Entwicklung eines breiten Spektrums verschiedener aber für den jeweiligen Lebensraum der Algenspezies spezifischer Begleitpigmente (engl.: Accessory Pigments). Diese Pigmente sind in der Lage, Licht auch außerhalb des Absorptionsspektrums von Chlorophyll a zu absorbieren. Die Energie wird dann durch einen Resonanztransfer an das Chlorophyll a Reaktionszentrum überführt. Beispiele für Begleitpigmente sind Chlorophyll b und Beta-Carotin (Takaichi, 2011; Young et al., 1993; Gantt, 1975). Chlorophyll wird durch Lichtabsorption angeregt. Je nach absorbierten Lichtquanten wird ein Singulett oder Triplet Zustand erreicht. Durch Absorption von Lichtquanten des Wellenlängenbereiches um 700 nm wird ein Anregungszustand erreicht, dessen Halbwertszeit ausreichend lang ist, um Elektronen an einen primären Akzeptor abzugeben. Dies bedeutet, dass durch Lichtabsorption das Chlorophyll sein Redox-Potential ändert. Im angeregten Zustand ist Chlorophyll in der Lage, ein Elektron auf Sauerstoff zu übertragen. Hierbei wird ein Sauerstoffradikal gebildet, das unkontrolliert mit anderen Verbindungen (Pigmenten, DNA oder ungesättigten Fettsäuren) reagieren und der Zelle Schaden zufügen kann. Bei einer direkten Exposition von konventionellen Landpflanzen oder Algen bei sehr hohen Lichtbedingungen ist Licht im Überschuss schädlich für den Photosyntheseapparat. Ein Überschuss liegt dann vor, wenn absorbierte Lichtenergie nicht ausreichend schnell über den photosynthetischen Elektronentransport abgeführt und in der Photosynthese zum Aufbau von Biomasse genutzt werden kann. Eine Radikalbildung findet nicht statt, wenn die angeregten Elektronen schneller abgeführt werden, als sie zur Radikalbildung fähig sind. Mikroalgen und konventionelle Landpflanzen besitzen in ihren Hilfspigmenten Schutzmechanismen. Hierbei kann Anregungsenergie auch auf Hilfspigmente übertragen werden. Gleichwohl können Hilfspigmente bei ungünstigen Lichtbedingungen das Absorptionsspektrum erweitern und Energie aufnehmen und an das Chlorophyll weiterleiten. Die Hilfspigmente sind in ihrem angeregten Zustand weniger elektronegativer als Chlorophyll. Aus diesem Grund können sie keine Elektronen auf Sauerstoff übertragen und eine Bildung von Sauerstoffradikalen wird verhindert. Kehren diese Pigmente in ihren Grundzustand zurück, wird die absorbierte Energie als Wärmeenergie abgegeben. Neben den typischen Hilfspigmenten der Mikroalgen ist auch Betacarotin an derartigen Schutzreaktionen beteiligt (Falkowski and Raven, 2007).

Eine weitere Herausforderung im Lebensraum Wasser ist die Versorgung mit ausreichend

Kohlendioxid. Dieses breitet sich in Wasser aufgrund des geringeren Diffusionskoeffizienten langsamer aus als in Luft (Rammert and Pahl, 1991). Für die photosynthetische Kohlendioxid-Fixierung (Calvin Zyklus) werden große Mengen an Kohlendioxid benötigt. Um sicherzustellen, dass immer genügend Kohlendioxid für die Photosynthese vorhanden ist, haben Algen Mechanismen und Enzyme für die Regulation der Kohlendioxidkonzentration entwickelt. Als Beispiel sei hier das Enzym Carboanhydrase genannt, das die Gleichgewichts-Einstellung zwischen gelöstem CO_2 und HCO_3^- beschleunigt.

Rubisco katalysiert letztlich den Einbau von Kohlendioxid-Molekülen in organischen Verbindungen. Je nach Temperatur und Aktivierungszustand zeigt Rubisco unterschiedliche Affinitäten für Sauerstoff und Kohlendioxid. Sauerstoff trifft häufiger auf als Kohlendioxid und konkurriert mit diesem um die katalytischen Zentren von Rubisco (Caemmerer and Quick, 2004). Falls Sauerstoff am katalytischen Zentrum von Rubisco bindet, resultiert dies in dem Prozess der Photorespiration. Dabei wird O_2 an Stelle von CO_2 auf das Akzeptermolekül Ribulose-1,5-bisphosphat übertragen. Es entstehen an Stelle von 2C_3 Körpern ein C_3 und ein C_2 Körper. Der gebildete C_2 Körper ist zudem toxisch. Zwei dieser C_2 Körper werden auf dem Wege der Photorespiration zu dem im Calvin Zyklus benötigten C_3 Körper umgesetzt, wobei CO_2 freigesetzt wird. Dies hat eine Verringerung der organischen Kohlenstoff Menge zur Folge (Falkowski and Raven, 2007; Graham et al., 2009).

2.1.1.3 Vermehrung und Wachstum

Die Fortpflanzung von Algen kann sexuell sowie vegetativ erfolgen. Durch die sexuelle Vermehrung wird die genetische Variabilität und somit die Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen gefördert. Die vegetative Vermehrung beinhaltet nicht die Verschmelzung der Gameten oder eine Meiosis. Die Mehrzahl einzelliger Algen vermehren sich vegetativ durch eine einfache longitudinale oder transversale Zellteilung. Unter optimalen Kulturbedingungen führt die vegetative Vermehrung zu einem schnellen Populationswachstum (Sheehan et al., 1998; Graham et al., 2009). Das Wachstum von einzelligen Mikroalgen wird nicht wie bei höheren Pflanzen in Größe oder Gewicht bestimmt, sondern in der Erhöhung der Zellzahl. Formell wird diese als Zellkonzentration bezeichnet, die definiert ist als die Anzahl von Zellen pro Volumeneinheit. Dabei durchläuft das Wachstum der Algen verschiedene Phasen (Raven et al., 2000). In Abbildung 2.1 sind die verschiedenen Wachstumsphasen dargestellt. Die einzelnen Phasen sind wie auch bei anderen Mikroorganismen:

1. Lag-Phase (Adaptionsphase)
2. Log-Phase (Exponentielle Phase)
3. Stationäre Phase
4. Absterbephase

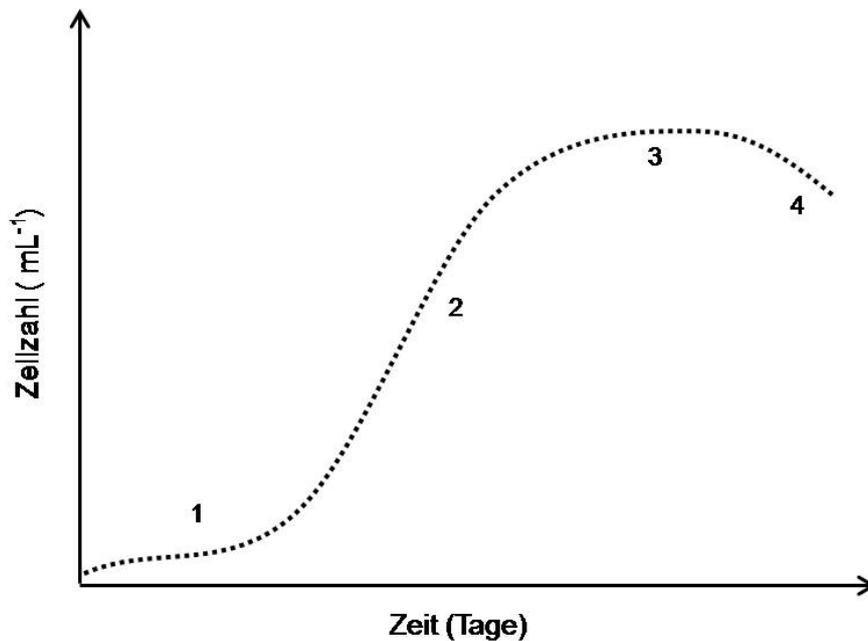


Abbildung 2.1: Wachstumsphasen von Algenkulturen

Lag-Phase: Nachdem die Algen in das Medium inokuliert werden, benötigen diese für die Adaption an die neue Umgebung eine gewisse Zeit. Nach dieser Adaptionszeit beginnt das Algenwachstum (Raven et al., 2000).

Log-Phase: Nach der Adaptionsphase beginnt das exponentielle Wachstum, solange alle Wachstumsfaktoren in ausreichendem Maße zur Verfügung stehen. Sobald ein Wachstumsfaktor limitierend wird oder ein weiterer Faktor das Wachstum hemmt, klingt die Wachstumskurve ab (Raven et al., 2000).

Stationäre Phase: Licht ist ein limitierender Faktor geworden und es stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Algenzuwachs und Algendegradation ein. Die Wachstumskurve erreicht bei einem geschlossenem System in dieser Phase ihr Maximum (Raven et al., 2000).

Absterbephase: In dieser Phase nimmt die Wachstumskurve ab, da die Geschwindigkeit der Abnahme durch Seneszenzvorgänge die Teilungsrage übersteigt. Die Seneszenz wird von internen Botenstoffen gesteuert. Dies ist ebenso wichtig, wie auch auftretende

Infektionen eine Rolle spielen, da sterbende Zellen Stoffe freisetzen, die beispielsweise Bakterien als Nährmedien dienen. Am Ende dieser Phase ist ein exponentielles Absterben zu verzeichnen, welches letztendlich zu einem Ende der Kultur führt (Raven et al., 2000).

2.1.1.4 Stoffaufnahme und zelluläre Transportmechanismen

Für das Algenwachstum ist neben Licht, Wasser und Kohlendioxid ein breites Spektrum an mineralischen Nährstoffen erforderlich. Für die beiden wichtigsten Nährstoffe Phosphat und Nitrat sollen im Folgenden die Transportwege erleutert werden. Die Nährelemente werden über Transportproteine der Plasmamembran aufgenommen. Der Transfer von Nitrat durch die Plasmamembran wird durch einen H^+/NO_3^- -Symport gewährleistet (Glass and Siddiqi, 1995). Ein Symport ist ein gleichzeitiger Transport von zwei Substanzen in die gleiche Richtung. Bei einem sekundär-aktiven Transport ist die Triebkraft ein elektrochemisches Potential über eine Membran. Im einfachsten Fall besteht das Potential aus einem Protonengradienten der von einer H^+ ATPase aufgebaut wird (Richter, 1998).

Die Aufnahme von P_i läuft über einen H^+ Symport ab. Dieser Symport ist auf die Funktion einer H^+ ATPase der Plasmalemma angewiesen. Hierdurch wird H^+ unter Verbrauch von ATP (primär-aktiver Transport) aus der Zelle ausgeschieden und es entsteht ein Membranpotenzial. Gemäß des elektrochemischen Gradienten findet die P_i -Aufnahme über einen H^+/P_i Symport statt (sekundär-aktiver Transport) (Rausch and Bucher, 2002). Die Transporterproteine für Phosphat (P_i) werden in drei Gruppen eingeteilt: Pht1, Pht2 und Pht3. Pht1- und Pht2-Proteine sind in der Plasmamembran und der inneren Hülle von Plastiden lokalisiert, während Pht3 mitochondriale Phosphattransporter sind (Karan-dashov and Bucher, 2005).

2.1.2 Stoffliche und energetische Nutzung

Mikroalgen bilden eine große Gruppe photosynthetisch autotropher Organismen, von denen ca. 15 Organismen in kommerzieller Nutzung sind (Raja et al., 2008). Biomasse aus Algen kann vielfältig eingesetzt werden. Einsatzmöglichkeiten sind: Nahrungsmittel, Tierfutter, biologische Dünger, Mittel zur Bodenverbesserung, Therapeutika, Pigmente, Hormone, Feinchemikalien und Biodiesel. Einige Mikroalgen binden Schwermetalle, Pathogene und Nährstoffe. Ferner sind sie Rohstoffe für Biogasanlagen (Munoz and

Guieysse, 2006). Studien zeigen weiter, dass Mikroalgen für die biologische Reinigung von Abwässern genutzt werden können (Becker, 1994).

2.2 Bioreaktoren

2.2.1 Allgemeines

Bioreaktoren sind die wichtigsten Komponenten in jedem biotechnologischen Produktionsprozess. In ihnen können Mikroorganismen in einer kontrollierten Umgebung heranwachsen. Da verschiedene Prozesse hohe spezifische Anforderungen haben, gibt es Bioreaktoren in verschiedenen Bauarten und Größen. Auch wenn Bioreaktorsysteme bereits weitreichend beschrieben wurden, so erfordert die stetige Weiterentwicklung biotechnologischer Anwendungsgebiete eine laufende Anpassung bestehender und die Erforschung neuer Bioreaktorsysteme. Nicht nur bei industriellen Anwendungen sondern auch in der wissenschaftlichen Forschung sind Bioreaktoren unersetzbar. Sie sind in einer Vielzahl von Größen und Varianten erhältlich. Die Auswahl eines Bioreaktorsystems ist besonders abhängig von dem Organismus und den Randbedingungen des jeweiligen biotechnologischen Prozesses.

Tabelle 2.1 gibt einen allgemeinen Überblick über Bioreaktoren und ihre Eigenschaften wieder, welche in der Biotechnologie im Einsatz sind. Es werden Bioreaktoren der Bauarten Open-Pond, Rührreaktor, Röhrenreaktor, Airliftreaktor und Schüttelreaktor verglichen. Im weiteren Verlauf dieses Abschnittes werden diese Bioreaktoren im Detail beschrieben.

Wichtige Eigenschaften von Bioreaktortypen sind das Oberflächen/Volumen-Verhältnis (O/V-Verhältnis) (Materialverbrauch, Lichtnutzung), die Möglichkeit des Up-Scalings (Übertragbarkeit auf ein anderes System), die Lichteffizienz (Nutzung der Lichtenergie für die Photosynthese), der hydrologische Stress (Stresserzeugung bei der Durchmischung der Kultur), die Sterilisierbarkeit (Handhabung bei der Sterilisierbarkeit), die Durchmischung (Durchmischung ohne Ablagerungen), die Temperaturkontrolle (Regelung der Algensuspensionstemperatur) und der Gasaustausch (Austauschfähigkeit von Gasen aus der bzw. in die Algensuspension).

Tabelle 2.1: Eigenschaften von Bioreaktoren verändert nach (Borowitzka, 1999; Suh and Lee, 2003; Posten, 2009)

Reaktortyp	Open-Pondreaktor	Rührreaktor	Röhrenreaktor	Airliftreaktor	Schüttelreaktor
Eigenschaften					
O/V-Verhältnis [$m^2 m^{-3}$]	2-5	1-320	10-170	50-132	50-70
Scale-up-Möglichkeit	schwierig	schwierig	gut möglich	gut	schwierig
Lichteffizienz	ausreichend	befriedigend	sehr gut	sehr gut	ausreichend
hydrologischer Stress	gering	hoch	gering-mittel	gering-hoch	gering
Sterilisierbarkeit	sehr schlecht	gut	schlecht	mittel	gut
Durchmischung	mechanisch	mechanisch	pneumatisch	pneumatisch	mechanisch
Temperaturkontrolle	keine	sehr gut	gut	gut	ausreichend
Gasaustausch	sehr gering	mittel	schlecht	sehr gut	mittel

2.2.2 Open-Pond-Systeme

Open-Ponds sind offene Systeme, die das photoautotrophe Wachstum von Algen ermöglichen. Einerseits können Open-Ponds in der natürlichen Umwelt vorkommen, wie zum Beispiel Seen, Teiche oder Stauseen. Andererseits sind aber auch künstliche Anlagen wie Becken oder Container möglich. Die am häufigsten verbreiteten Systeme sind künstliche Systeme wie „raceway ponds“ (Suh and Lee, 2003). In diesen zirkuliert die Kultur in einem verbundenen schlaufenartigen Becken. Durch ein Paddel wird die Algensuspension durchmischt und die Algen gelangen hierdurch regelmäßig an die lichtreiche Oberfläche. Vorteile von Open-Ponds sind die günstige Bauweise und der einfache Betrieb. Nachteile sind die geringe Lichteffizienz, Verluste durch Verdunstung, schlechte Kontrolle der Kulturbedingungen, keine Sterilisierbarkeit und sehr geringes Oberflächen-Volumenverhältnis. Der wesentliche Unterschied von Open-Pond-Systemen zu Rührreaktor-Systemen ist das höhere Oberflächen-Volumenverhältnis bei Open-Pond-Systemen und die Möglichkeit der Temperaturregulierung bei Rührreaktor-Systemen (Borowitzka, 1999; Suh and Lee, 2003; Posten, 2009).

2.2.3 Rührreaktor-Systeme

Rührreaktoren besitzen einen zentralen Rührmechanismus sowie Öffnungen an den Seiten. An dieser Stelle wird mit zahlreichen Sensoren und Motoren eine spezifische Prozessüberwachung und -regelung realisiert (Schuegerl, 1997). Mit einem Rührreaktor ist es möglich, Bioreaktorprozesse zuverlässig zu betreiben. Oftmals stehen Anwendern nur Rührkesselbioreaktoren im Labormaßstab (1 bis 100 L) zur Verfügung. Als ein Beispiel für einen Rührkesselbioreaktor ist der Spinner Flask zu nennen (SI, 2011). Wird in einem frühen Stadium einer Bioprozessentwicklung mit solchen Geräten eine Vielzahl von Experimenten mit Wiederholungen durchgeführt, so ist der finanzielle, technische und zeitliche Aufwand sehr groß. Diese kleineren Systeme haben ein Reaktorvolumen von weniger als 100 mL. Dies ermöglicht eine einfachere und kostengünstigere Kulturführung als mit Reaktoren im größerem Maßstab (1 bis 100 L). Trotzdem ist der sehr hohe Anschaffungspreis negativ zu bewerten (SI, 2011).

2.2.4 Airliftreaktor-Systeme

Airliftreaktoren gehören zu den meist verwendeten Reaktortypen in der Mikroalgenbiotechnologie (Borowitzka, 1999). Diese Reaktoren basieren auf einem einfachem Prinzip, bei dem die Durchmischung des Reaktorvolumens nicht durch einen Rührer, sondern durch die Begasung am Boden des Kulturgefäßes sichergestellt wird. Wenn der Airliftreaktor mit Filtern als geschlossenes System betrieben wird, hat dieser Reaktor alle positiven Eigenschaften eines Rührreaktors. In den meisten Fällen bestehen diese Reaktoren aus Polyethylen- oder Glasmaterialien, welche eine hohe Transmission aufweisen. Ein Scale-up dieser Systeme ist möglich. Scherkräfte, die beim Platzen von Gasblasen auftreten können allerdings problematisch sein. Die Algenkultur wird durch Scherkräfte mechanisch belastet. Es kommt zu Schaumbildung von älteren Kulturen mit negativem Einfluss auf das Wachstum.

Carvalho et al. (2006) zeigen in ihrer Veröffentlichung eine Übersicht über mögliche Begasungseinheiten bei Photobioreaktoren für Mikroalgen. Die in Abbildung 2.2 C-E dargestellte Begasung ist die am häufigsten benutzte Begasungsvariante (Carvalho et al., 2006). Mit Hilfe der Begasung werden Ablagerungen am Reaktorboden vermieden. Hierfür muss diese aber eine kontinuierliche Strömung erzeugen (Becker, 1994).

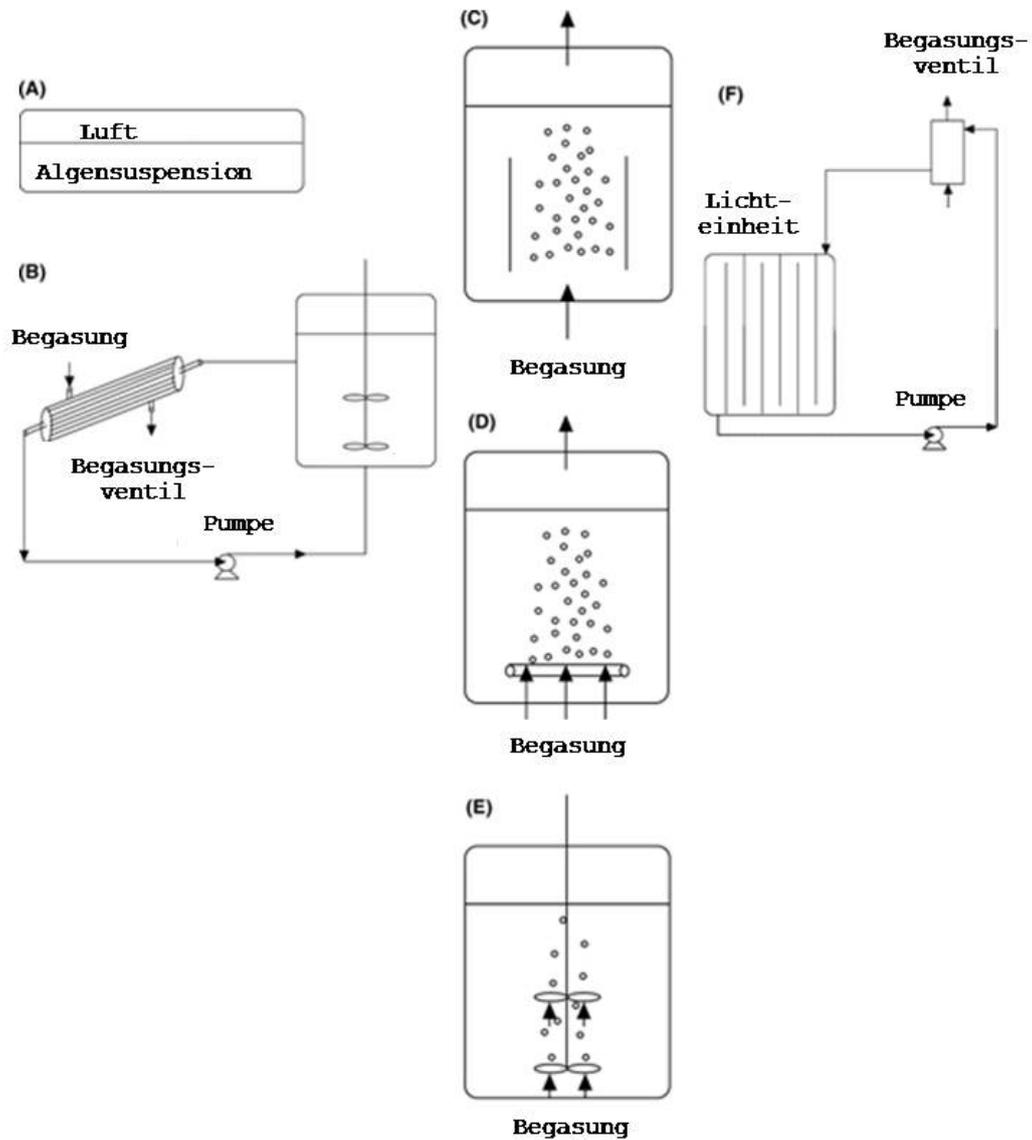


Abbildung 2.2: Mögliche Begasungseinheiten bei Photobioreaktoren für Mikroalgen. Begasung über (A) Oberfläche, (B) Hohlfasermembran, (C) Loop-Airlift, (D) Blasensäule, (E) Rührereinheit und (F) Gaswechselsystem (verändert nach Carvalho et al., 2006)

2.2.5 Schüttelreaktor-Systeme

Bei geschüttelten Bioreaktoren sorgen ein- bzw. zweidimensionale Bewegungen einer Plattform für eine Bewegung der Algensuspension. Hierdurch wird eine Durchmischung erreicht und zugleich die Oberfläche des Kulturmediums kontinuierlich verändert. Dies ermöglicht einen blasenfreien Gasaustausch des Kulturmediums über die Oberfläche. Auf dem Markt existieren verschiedene Bauformen von Schüttelreaktoren. Die ältesten und meist verwendeten Reaktorgefäße sind Erlenmeyerkolben aus Glas. Weiterhin werden Kulturflaschen aus Kunststoff sowie Kulturbeutel aus Folienmaterialien eingesetzt. Der Anteil an Kulturbeuteln aus Folienmaterialien steigt (Eibl, 2009). Die Durchmischung kann entweder durch eine horizontale Bewegung (Schüttler) oder vertikale Bewegung (Wippe) erzeugt werden. Vorteile dieser Kulturform sind die einfache Handhabbarkeit, sowie der flexible Einsatz. Nachteilig wirkt sich jedoch der schlechte Gasaustausch, der hohe Platzbedarf und die hohen Anschaffungskosten aus. Zudem müssen die wiederverwendeten Kulturgefäße gewaschen und sterilisiert werden.

Mikrotiterplatten können ebenfalls als Schüttelbioreaktoren verwendet werden und sind seit den 1950er Jahren überwiegend für analytische Zwecke, später auch in der pharmazeutischen und chemischen Produktion im Einsatz (Manns, 1999). Sie bieten die Möglichkeit, vollautomatisch eine hohe Anzahl an parallelen Experimenten im Miniaturmaßstab durchzuführen. Anwendungsbeispiele sind in der Zellkultur und high-throughput-screening (HTS) zu finden (Nakayama, 1998). Es sind eine Vielzahl an verschiedenen Mikrotiterplatten erhältlich. Die Anzahl von „wells“ variiert von 6 bis 1536 kombiniert mit verschiedenen Bauformen sowie Volumina. Weiterhin sind Mikrotiterplatten mit Online-Sensoren für pH-Wert und gelösten Sauerstoff erhältlich (Weiss et al., 2002; John et al., 2003; Stitt et al., 2002). Nachteile einer Mikrotiterkultur sind die Kontaminationsmöglichkeiten der einzelnen „wells“ und die niedrigen Gasaustauschraten (Duetz and Witholt, 2001). Geringe Schüttlerbewegungen haben eine schlechte Durchmischung zur Folge, was eine Online-Messung der Kulturparameter erschwert (Weiss et al., 2002). Des Weiteren ist eine Verdunstung des Kulturmediums bei sehr langsam wachsenden Kulturen ein Problem. Dies kann aber durch Abdeckungen verringert werden (Duetz and Witholt, 2001; Zimmermann et al., 2003). Um Proben für weitergehende Analysen zu entnehmen, muss der Schüttelvorgang unterbrochen werden. Durch das geringe Probenvolumen sind lediglich Mikro-Analysen möglich. Da bei sehr geringen Durchmessern der Mikrotiterplatten die Oberflächenspannung des Mediums erhöht wird, ist weder die Durchmischung noch der

Gasaustausch zufriedenstellend (Zimmermann, 2005).

2.2.6 Photobioreaktor-Systeme

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, sind Bioreaktoren in verschiedenen Bauarten und Größen erhältlich. Für die Kultivierung von Mikroalgen sind Photobioreaktoren unumgänglich, da Mikroalgen photosynthetisch aktive Organismen sind. Für die Photosynthese wird Lichtenergie benötigt, welche entweder natürlich (Sonnenlicht) oder auch künstlich (Leuchtmittel) bereitgestellt werden kann. Photobioreaktoren mit natürlicher Belichtung sind in der Regel Open-Pond- und Flachplatten-Systeme. Photobioreaktoren im Labormaßstab sind in der Regel künstlich belichtet (Ugwu et al., 2008). Für jede Kultur muss ein Kompromiss zwischen optimalem Gasaustausch, optimaler Durchmischung und Erhalt der Integrität der Algenzellen getroffen werden. Die Auswahl eines Photobioreaktors für einen spezifischen biotechnologischen Prozess umfasst Kenntnisse über die zu kultivierenden Organismen und mikrobiologischen und biochemischen Anforderungen (Zimmermann, 2005).



Abbildung 2.3: Multicultivator MC 1000 OD der Firma Photon Systems Instruments (verändert nach PhotonSystemsInstruments, 2011)

Alternative Photobioreaktoren, welche für ein Screening von Mikroalgen geeignet sind, stellt die Firma Photon Systems Instruments her. Der Multi-Cultivator MC 1000 (Abbildung 2.3) besitzt acht Reagenzgläser mit einem Arbeitsvolumen von 85 mL. Die Temperierung erfolgt über ein Wasserbad, in dem die Reagenzgläser eingestellt sind. Die Belichtung erfolgt über ein LED-Pannel und die Begasung erfolgt durch einen Begasungs-

schlauch, der durch einen Verschluß-Stopfen geführt wird. Die OD (Optische Dichte) kann bei 680 nm und 735 nm gemessen werden.

Weiterhin ist als Photobioreaktor der Minibioreaktor zu nennen (Abbildung 2.4). Dieser kann die Kulturbedingungen in jeder Reaktorkassette kontrollieren, da in jedem „well“ pH-Wert, gelöster Sauerstoff und Temperatur gemessen wird. Eine Begasung findet über eine sterile 0,2 μ Membran statt. Die aus klarem Polystyrol bestehenden Kassetten des Minibioreaktors können mit einer gaspermeablen, selbstklebenden Folie verschlossen werden

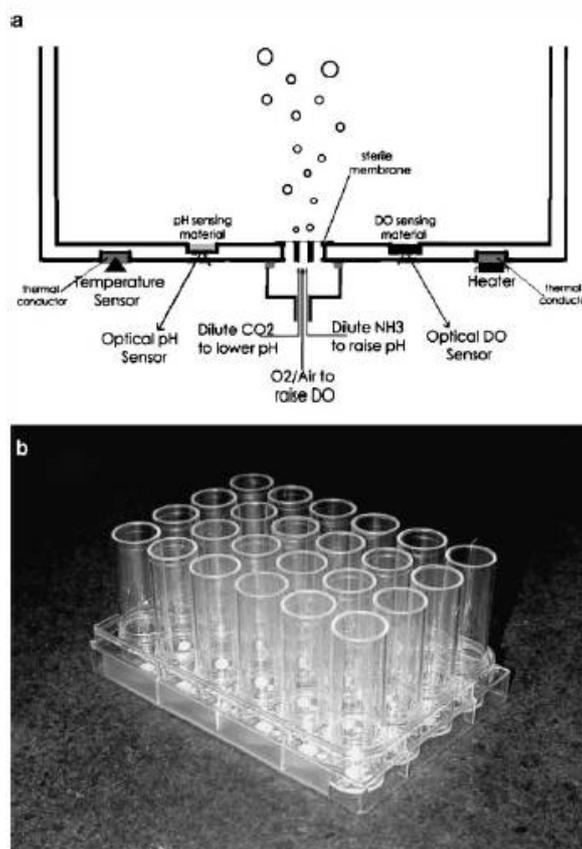


Abbildung 2.4: Der Minibioreaktor: (a) Schematischer Aufbau des Minibioreaktors; (b) Foto des Minibioreaktors (verändert nach Tang et al., 2006)

Der Photobioreaktor FMT 150/400 und FMT 150/1000 von Photon Systems Instruments beinhaltet eine Kombination aus Kultivierungs- und Sensoreinheit (siehe Abbildung 2.5). Dieser Photobioreaktortyp ist in zwei Versionen mit unterschiedlichen Volumina (0,4 L und 1 L) erhältlich. Ausgestattet ist der FMT 150 mit einer LED-Belichtung, Chlorophyll-Fluorometer und verschiedenen Kulturführungssensoren (Nedbal

et al., 2008).

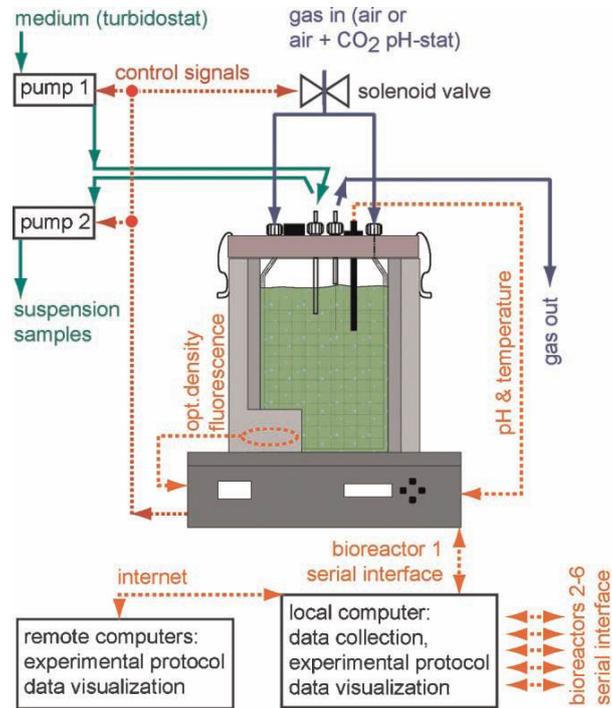


Abbildung 2.5: Schematischer Aufbau: Photobioreaktor FMT 150 von Photon Systems Instruments (PSI) (verändert nach Nedbal et al., 2008)

2.2.7 Einweg-Photobioreaktoren

Aus ökonomischen Gründen werden bei der Entwicklung und Herstellung von Biopharmazeutika zurzeit vermehrt Einweg-Photobioreaktoren genutzt. Nach Abschluss der Algenproduktion werden die Kulturgefäße entsorgt und somit nicht wiederverwendet. Heutzutage werden Einweg-Photobioreaktoren in fast allen Bioprozessen verwendet. Sie sind in verschiedenen Formen und Volumina je nach Anwendungszweck erhältlich. Die verschiedensten Einweg-Photobioreaktoren können anhand ihres Prinzips für die Durchmischung und der verwendeten Kulturen unterschieden werden (Eibl, 2009). Prinzipiell sind alle Bauformen, außer Open-Ponds, als Einwegreaktoren herstellbar.

Da diese Arbeit auf Einwegsysteme fokussiert, sind in Tabelle 2.2 die Eigenschaften verschiedener Photobioreaktoren aus Einwegmaterialien gegenübergestellt.

Tabelle 2.2: Photobioreaktoren aus Einwegmaterialien

Eigenschaften	Reaktorbeutel	Spinner Flask	Mikrotiterplatte	Kulturflasche	Flachplatte
Reaktortyp	Schüttel- Airliftreaktor	Rührreaktor	Schüttelreaktor	Schüttelreaktor	Airliftreaktor
Möglichkeit der HPLC-Analyse	ja	ja	nein	ja	ja
Platzbedarf	sehr hoch	hoch	sehr gering	sehr hoch	gering
Gasaustausch	gering	hoch	sehr gering	gering	sehr gut
Volumen	0,1-50 L	0,5-50 L	1-5 mL	0,05-0,5 L	0,5-50 L
Kultivierungsdauer	10 Tage	>30 Tage	1-2 Tage	10 Tage	10-20 Tage
Algenwachstum	mittel	gut	schlecht	mittel	sehr gut
Preis pro Probe	2 Euro	>100 Euro	0,04 Euro	2 Euro	>100 Euro

Bewertungen und Kostenabschätzungen z. T. auf Basis von Herstellerangaben (PhotonSystemsInstruments, 2011; Nedbal et al., 2008; Tang et al., 2006; Sartorius-Stedim, 2011; SI, 2011; Borowitzka, 1999; Suh and Lee, 2003; Posten, 2009; Carvalho et al., 2006)

2.3 Hochdurchsatzuntersuchungen (Screening)

2.3.1 Definition

Unter einem biologischem Screening versteht man die Suche nach Substanzen/Organismen mit einer bestimmten Wirkung (Reaktion oder Wachstum). Beispielsweise nutzt man einen Plattendiffusionstest um deskriptive Aussagen über Wachstumsraten machen zu können. Unter einem chemischem Screening versteht man die Suche nach unbekanntem chemischen Verbindungen in biologischen Organismen. Diese Suche steht nicht in direkter Verbindung mit einem physiologischem Effekt. Beispielsweise nutzt man Chromatographie- und Massenspektroskopie-Verfahren, um die Zusammensetzung und die Konzentrationsverhältnisse in einer Probe zu analysieren.

2.3.2 Analysemöglichkeiten

Die Entwicklung von biotechnologischen Prozessen und die Optimierung der Kulturführung erfordert ein ausgedehntes, oftmals teures Screening neuer Arten und angepasster Kulturparameter. Eine erfolgreiche Algenbiotechnologie hängt maßgeblich von der Auswahl der richtigen Alge für die jeweilige Anwendung ab. Des Weiteren ist die Wahl geeigneter Wachstumsparameter, wie zum Beispiel des Temperaturbereichs, der Belichtungsstärke, der Begasung und der Kulturmedien in Photobioreaktortechnologien bedeutend (Eriksen, 2008; Ugwu et al., 2008). Aufgrund der Kombinations- und Validierungsmöglichkeiten dieser Faktoren erhöht sich die Anzahl notwendiger Experimente stark. Somit wird deutlich, dass ein Hochdurchsatzscreeningsystem Vorteile bei der Durchführung von vielen parallelen Experimenten mit sich bringt (Halama, 2009). In Abbildung 2.6 ist die Analysemöglichkeit bei einem Einzelexperiment gegenüber Parallelexperimenten bei einem Einsatz von verschiedenen Photobioreaktoren dargestellt. Jeder biotechnologische Prozess muss dabei im Labormaßstab studiert und optimiert werden, bevor ein „upscaling“ hinsichtlich des zu erwarteten Endproduktes bzw. der zu erwarteten Produktionsrate durchgeführt wird. Mittels eines Massenscreenings kann dieses kosteneffizient durchgeführt werden (Hoffmann, 2010).

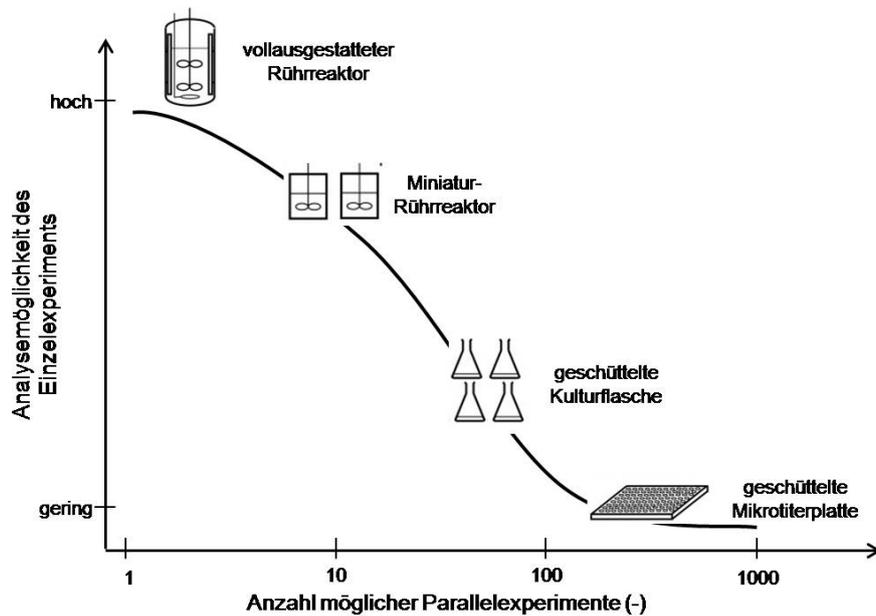


Abbildung 2.6: Darstellung der Analysemöglichkeiten bei einem Einzelexperiment gegenüber Parallelexperimenten bei einem Einsatz von verschiedenen Photobioreaktoren (verändert nach Betts, 2006; Voelkening et al., 2004)

2.3.3 Einsatzgebiete

Die Screening-Einsatzgebiete lassen sich in verschiedene Gruppen unterteilen. Bei einem biologischen Screening von Algen bestehen diese aus:

1. Toleranzuntersuchungen

Ein Toleranz-Screening hat das Ziel, Grenzwerte für Wachstum und Vitalität der Mikroalgen in bestimmten Umgebungen zu ermitteln. Hierzu gehört beispielsweise die Optimierung von Wachstumsparametern in industriellen Prozessen.

2. Stoffanalysen

Ein Stoff-Screening hat das Ziel, einerseits bekannte Inhaltsstoffe und deren Verlagerungen zu untersuchen und andererseits neue Inhaltsstoffe zu finden. Beispiele für ein Stoff-Screening findet man bei der Reinigung von Abwässern (Schwermetalle, Nährstoffe wie Phosphat) sowie bei der Herstellung von Stoffen wie Carotinoide oder Astaxanthin.

3. Phäno- und Genotypisierungen

Ein Screening im Bezug auf eine Phäno- und Genotypisierung hat zum Ziel, eine

unbekannte Algenspezies zu charakterisieren sowie taxonomisch und phylogenetisch Einzuordnen. Auch physiologische Untersuchungen werden sehr häufig im Zusammenhang mit Phäno- und Genotypisierungen durchgeführt. Diesbezügliche Untersuchungen werden vorzugsweise von Kultursammlungen durchgeführt.

2.4 Optische Online-Analytik

2.4.1 Definition Online-Analytik

Unter Online-Analytik versteht man die Erfassung von Prozessinformationen („ex-situ“ oder „in-situ“) in Reaktorsystemen, welche einerseits für die Prozessführung und andererseits für die Produktuntersuchung benötigt werden (Schügerl et al., 1987).

2.4.2 Kopplung von Sensoren und Bioreaktoren

In Abbildung 2.7 sind die unterschiedlich möglichen Kopplungen von Sensoren und Bioreaktoren dargestellt. Einerseits sind Unterscheidungskriterien im Hinblick auf den Messort (in-situ vs. ex-situ) erkennbar. Andererseits wird bei der Art der Messung zwischen einer direkten und indirekten bzw. sterilen und unsterilen Vorgehensweise unterschieden.

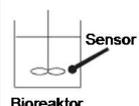
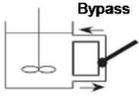
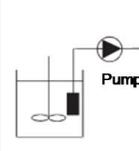
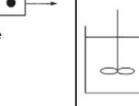
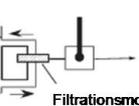
Art des Sensorsystems	 Bioreaktor	 Bypass	 Pumpe	 Filtrationsmodul	
Messort	in-situ	in-situ	ex-situ	ex-situ	ex-situ
Art der Messung	direkt & steril	direkt & steril	direkt & steril	direkt & steril	indirekt & unsteril

Abbildung 2.7: Darstellung möglicher Kopplungen von Sensoren und Bioreaktoren (verändert nach Beutel, 2011; Bluma et al., 2011; Chmiel, 2011; Rehbock et al., 2008)

2.4.3 Optische Messverfahren

Optische Messverfahren werden beispielsweise für die Erfassung von Prozessinformationen in Reaktorsystemen verwendet. Für die Erfassung werden bei diesen Verfahren häufig elektromagnetische Spektren benutzt. Es bezeichnet die Gesamtheit aller elektromagnetischen Wellen unterschiedlicher Energie. Das gesamte Spektrum wird zur besseren Unterscheidung in verschiedene Bereiche unterteilt. Abbildung 2.8 zeigt einen Ausschnitt aus dem gesamten Spektrum (Skrabal, 2009).

Bezeichnung des Wellenlängenbereichs	UV: Ultraviolett	VIS: sichtbares Licht	NIR: nahes Infrarot	IR: Infrarot	Bezeichnung des Wellenlängenbereichs
Wellenlänge in nm	200 – 420	420 – 780	780 – 2500	2500 – 20000	Wellenlänge in nm

Abbildung 2.8: Ausschnitt aus dem elektrom. Spektrum (verändert nach Skrabal, 2009)

Es sind die Bereiche Ultraviolett (UV), sichtbares Licht (VIS), Nah-Infrarot (NIR) und Infrarot (IR) dargestellt. Bei der UV/VIS-Spektroskopie werden Absorptionsspektren im sichtbaren und ultravioletten Bereich gemessen. Durch die wellenlängenabhängige Absorption von Licht werden die Moleküle der Algensuspension aufgrund ihrer Wechselwirkung mit den elektromagnetischen Wellen angeregt. Anhand der Absorptionsbanden des eingestrahnten Lichtes können die funktionellen (chromophoren) Gruppen eines Moleküls qualitativ analysiert werden. Maximale Anregung der verschiedenen Gruppen findet jeweils bei charakteristischen Wellenlängen statt (Skrabal, 2009). Wird die Transmission, die Abschwächung (Extinktion) bzw. die Absorption bei bestimmten Wellenlängen gemessen, werden die resultierenden Signale zur Bestimmung der optischen Dichte (OD) und damit zur Konzentrationsbestimmung verwendet. Im allgemeinen gilt dann das Lambert-Beersche Gesetz (Perkampus, 1986):

$$E_{\lambda} = \lg \frac{I_0}{I_1} = \epsilon_{\lambda} * c * d \text{ mit}$$

E_{λ} : Extinktion (Absorption des Materials für Licht der Wellenlänge λ) (-)

I_0 : Intensität des transmittierten Lichtes ($W * m^{-2}$)

I_1 : Intensität des einfallenden (eingestrahnten) Lichtes ($W * m^{-2}$)

c Konzentration der absorbierenden Substanz in der Flüssigkeit ($mol * L^{-1}$)

ϵ_{λ} : spektraler Absorptionskoeffizient bei der Wellenlänge λ (-)

d : Schichtdicke des durchstrahlten Materials (m).

Durch Vergleich mit einer Kalibrierreihe über einen definierten Konzentrationsbereich ist es so möglich, eine Probe unbekannter Konzentration quantitativ zu analysieren. Neben der Extinktion wird die Fluoreszenz von Stoffen häufig zur quantitativen und qualitativen Analyse genutzt. Die Fluoreszenz ist dabei die Folge der Photolumineszenz:

Moleküle absorbieren Energie durch eine Strahlungsanregung im ultravioletten bis infrarotem Wellenlängenbereich. Nach einer gewissen Zeit geben sie diese Energie wieder als Strahlungsenergie ab. Bei der Fluoreszenz wird die absorbierte Energie innerhalb von 0,1 ns bis 100 ns nach Anregung wieder abgegeben (Richter, 1998). Schematische Überblicke über die Absorption und Emission von Energiebündeln geben Jablonski-Diagramme¹ wieder (Förster, 1982; Atkins and de Paula, 2006). Sie zeigen die Energien der Elektronenübergänge, die bei Absorption und Emission von Photonen auftreten (siehe Abbildung 2.9).

Die Methode der Chlorophyllfluoreszenzmessung ist eine weit verbreitete Technik für

¹Ein Atom oder Molekül hat mehrere Energieniveauschemata, die sich unterteilen in Singulettzustände ($S_0 \dots S_n$) mit einem Gesamtelektronenspin von Null und in Triplettzuständen ($T_0 \dots T_n$) mit einem Gesamtelektronenspin von Eins. Zwischen benachbarten elektronischen Energiezuständen befinden sich Schwingungs- und Rotationsniveaus mit jeweils abnehmender Energiedifferenz zwischen den einzelnen Niveaus (Förster, 1982). Die Energieaustauschprozesse lassen sich in drei Gruppen unterteilen:

- Absorption elektromagnetischer Strahlung
- Innere Umwandlung, ohne Photonenemission
- Emission von elektromagnetischer Strahlung verursacht durch Energieübergang von einem höheren zu einem niedrigeren Niveau (Fluoreszenz oder Phosphoreszenz)

Eine Anregung liegt vor, wenn ausreichend Lichtenergie im ultravioletten (UV), sichtbaren (VIS) oder infrarotem (IR) Wellenlängenbereich absorbiert wird. Hierbei geht ein Elektron von dem energetisch niedrigen Grundzustand S_0 , also dem äußersten besetzten Molekülorbital, in einen energetisch höheren Singulett-Zustand S_n über. Dabei ändert sich nicht der Atomabstand innerhalb des Moleküls, da dieser Elektronenübergang schnell abläuft (Jaffe and Miller, 1966). Es gibt im Folgenden drei Möglichkeiten des Übergangs vom untersten nicht besetzten Molekülorbital S_1 in den Grundzustand S_0 :

1. Das Elektron fällt vom angeregten Zustand (S_1) unter Abgabe eines Photons (Fluoreszenzemission) in den Grundzustand S_0 zurück.
2. Erfolgt die Rückkehr des Elektrons in den Grundzustand (S_0) über einen strahlungslosen Übergang (strahlungslose Desaktivierung) vom angeregten Singulett-Zustand (S_1) durch Spinumkehr zu einem Triplett-Zustand (T_1), wird die überschüssige Energie bei einem wesentlich langsameren Übergang durch erneute Spinumkehr von T_1 zu S_0 als Phosphoreszenzstrahlung freigegeben.
3. Eine strahlungslose Alternative stellt die Übergangsmöglichkeit durch innere Umwandlung dar. Die Fluoreszenzemission muss demnach mindestens genauso schnell verlaufen wie die dazu im Wettbewerb stehenden strahlungslosen und photochemischen Prozesse, damit Fluoreszenzstrahlung auftreten kann (Förster, 1982; Atkins and de Paula, 2006).

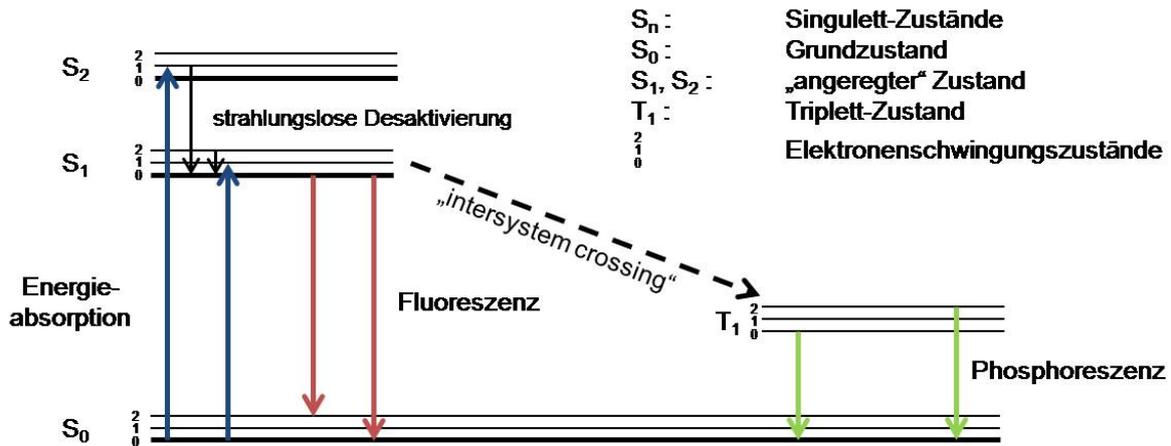


Abbildung 2.9: Jablonski-Diagramm (verändert nach Jaffe and Miller, 1966)

Pflanzen- und Ökophysiologen geworden, da sie besonders bei Stressbedingungen eine schnelle, nicht invasive Möglichkeit zur Bewertung der photosynthetischen Aktivität bietet (Lin and Hsu, 2004). Bei den Messungen werden die Eigenschaften des Photosyntheseapparates genutzt, wobei die Strahlungsenergie absorbiert wird, um diese für die Photosynthese zu nutzen. Überschüssige Energie wird in Form von Wärme freigegeben oder als Strahlung reemittiert (Chlorophyllfluoreszenz). Mit Hilfe der Chlorophyllfluoreszenzbestimmung kann durch eine Korrelation der drei Prozesse Information über die Veränderung der photochemischen Effizienz gewonnen werden. Veränderungen der Chlorophyllfluoreszenz wurden erstmals von Kautsky et al. (1960) entdeckt (Kautsky-Effekt). Nach der Belichtung dunkeladaptierter Blätter wird ein Anstieg der Chlorophyllfluoreszenz über einen Zeitraum von etwa einer Sekunde beobachtet. Dieser Anstieg kann durch die Reduktion von Elektronenakzeptoren im Verlauf der Photosynthese, dem Herunterfahren des Photosystems II, erklärt werden (Raven et al., 2000). Wenn das Photosystems II nach Anregung durch Lichtenergie ein Elektron auf einen primären Akzeptor übertragen hat, kann eine zweite Elektronenübertragung erst wieder erfolgen, wenn der primäre Akzeptor das erste Elektron auf den folgenden Akzeptor der photosynthetischen Elektronentransportkette übertragen hat. Während der Zeit, in der ein Elektron auf dem primären Akzeptor verweilt und eine Aufnahme von Elektronen aus dem Photosystem II verhindert, bezeichnet man das Reaktionszentrum von PS II als geschlossen. Da ein geschlossenes Reaktionszentrum absorbierte Energie nicht in Form von Redox-Energie (Elektronenabgabe) abführen kann, zeigt es bei Belichtung maximale Fluoreszenz. Nachdem die Komponenten der photosynthetischen Elektronentransportkette aus dem Dunkel-

Zustand in den für Elektronentransport optimierten Licht-Zustand übergetreten sind, erreicht die beobachtete Fluoreszenz einen Maximalwert. Der Rückgang der Fluoreszenz wird Fluoreszenz-Quenching genannt und ist auf zwei Arten zu erklären:

Dem photochemischen und dem nichtphotochemischen Quenching. Photochemisches Quenching beruht darauf, dass der Elektronentransport zunimmt, wenn das Enzymsystem des Calvin Zyklus, und der Zucker-Export aus dem Chloroplasten durch Licht aktiviert werden. Der Verbrauch von NADPH steigt und die Verweildauer von Elektronen auf den jeweiligen Akzeptoren sinkt mit Zunahme der Elektronentransport-Rate. Nichtphotochemisches Quenching geht darauf zurück, dass überschüssige Energie auf Hilfspigmente übertragen werden kann. Die Hilfspigmente, zum Beispiel Anthocyane, emittieren Energie in Form von Wärme. Die Nachbarschaft zwischen Hilfspigmenten und Chlorophyllen wird enger, wenn der pH-Wert innerhalb der Thylakoidmembran sinkt. Engere Nachbarschaft erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass angeregtes Chlorophyll Energie auf Hilfspigmente überträgt. Der pH-Wert innerhalb der Tylakoide wird um so saurer, je höher die Lichtintensität ist. Somit steigt nichtphotochemisches Quenching mit steigender Lichtintensität (Maxwell and Johnson, 2000). Eine spezielle Form des nichtphotochemischen Quenching stellt die Mehler-Reaktion dar. In diesem Fall überträgt angeregtes Chlorophyll ein Elektron direkt auf Sauerstoff unter Bindung eines Sauerstoff-Radikals (Mehler, 1951). Nichtphotochemisches Quenching stellt somit einen Schutz vor der Bildung toxischer Radikale dar.

2.4.4 Sensorsysteme

2.4.4.1 Allgemeines

Wie aus Tabelle 2.3 ersichtlich, basiert ein großer Teil moderner Online-Analytik auf spektrometrischen Methoden.

Tabelle 2.3: Verschiedene Sensorsysteme zur optischen Messung von biotechnologischen Prozessgrößen

Parameter	Sensor	Kultur	Anregung	Bioreaktor	Reaktorvolumen (L)	Literatur
Biomasse, Glucose, Ethanol	Flourimetrie, ex-situ, indirekt	Bakterien, Hefen	UV/VIS	Chemap AG, Schweiz	3,5/20	(Hagedorn et al., 2004)
NADH	Flourimetrie, in-situ, direkt	Bakterien, Hefen	365 nm	B.Braun, Melsungen	20	(Scheper and Schügerl, 1986)
ATP, Pyruvat	Flourimetrie, ex-situ, direkt	Hefen	340 nm	Kolben, Erlennmeyer	2	(Sato et al., 2000)
Biomasse	VIS-Spektroskopie, ex-situ, direkt	Mikroalgen	550 nm	B.Braun, Melsungen	2	(Meireles et al., 2002)
Biomasse	VIS/NIR-Spektroskopie, in-situ, direkt	Bakterien	400-2500 nm	Setric Genie Industriel, Frankreich	1,5	(Arnold et al., 2002)
Ethanol, Glucose, Biomasse,	IR-Spektroskopie, ex-situ, direkt	Hefen	5000-12500 nm	Kolben, Erlennmeyer	2	(Mazarevica et al., 2004)
Glucose, Ölgehalt	Raman-Spektroskopie, ex-situ, direkt	Mikroalgen	5555-10 ⁶ nm	Sartorius, Deutschland	2	(Venkat et al., 2011)

2.4.4.2 „in-situ“-Sensorsysteme

In-situ-Sensoren befinden sich direkt im Kulturmedium. Hierdurch müssen diese Sensoren vor der Kultur sterilisiert und in den Bioreaktor eingebaut werden. Dieses setzt hohe Anforderungen an den verwendeten Sensor voraus. Vorteilhaft ist bei diesen Systemen, dass die Daten für eine Prozessregelung ohne Zeitverzögerung zur Verfügung stehen. Andererseits ist der Einsatz von in-situ-Sensoren bei kleinen Bioreaktoren schwierig, da diese aufgrund ihrer Größe die Reaktorfunktionalität beeinflussen. Hier muss der Bioreaktor über einen Bypass den In-situ-Sensor mit der Probe kontinuierlich umströmen. Ein Nachteil dieser Methode ist die zeitverzögerte Prozessinformation (Chmiel, 2011).

2.4.4.3 „ex-situ“-Sensorsysteme

Bei diesen Systemen ist der Sensor außerhalb des Bioreaktors. Einerseits ist es möglich, dass die Probe über geeignete Systeme dem Bioreaktor entnommen wird und manuell außerhalb des Reaktors analysiert wird. Hierbei können mit entsprechenden Geräten fast alle Bestandteile, physikalische sowie chemische und biologische Parameter einer Kultur bestimmt werden. Nachteilig ist bei diesem zeitaufwendigen Verfahren, dass die Daten für eine Prozessregelung erst mit einer Zeitverzögerung zur Verfügung stehen. Die Schwierigkeit bei diesem System besteht zudem in der adäquaten Bereitstellung der Probe. Andererseits ist es möglich, mit Hilfe eines optischen Sensors die Probe innerhalb des Bioreaktors durch die Bioreaktorwand zu messen, so dass Prozessdaten direkt „Online“ zur Verfügung stehen (Beutel, 2011; Bluma et al., 2011).

3 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines Photobioreaktorsystems aus Einwegmaterialien, welches für die Kultur von Mikroalgen geeignet ist. Das zu entwickelnde System soll einen hohen Probendurchsatz bei möglichst hoher Reproduzierbarkeit gewährleisten. Die Vorteile einer Mikrotiterplatte (preiswerter hoher Probendurchsatz) sollen mit den Vorteilen eines vollausgestatteten Rührreaktors (größtmögliche Analysemöglichkeit) vereint werden.

Der Funktionstest des Screeningsystems soll anhand von Screening-Experimenten in den drei Hauptgruppen des biologischen Screenings stattfinden:

1. **Toleranzuntersuchungen** von salztoleranten Algenarten in einem extrem salzhaltigem Abwasser. Hierbei sollen nicht nur die Wachstumsraten sondern auch physiologischen Hintergründe, sowie die biotechnologische Anwendbarkeit erforscht werden.
2. **Stoffstromanalysen** von abwassertoleranten Algenspezies gegenüber vorgeklärtem Abwasser. Hierbei sollen die Stoffströme von Nitrat und Phosphat untersucht werden.
3. **Phäno- und Genotypisierungen** einer unbekanntes Algenart.

4 Material und Methoden

4.1 Entwicklung eines Screeningsystem-Prototyps

4.1.1 Photobioreaktor-Prototyp

4.1.1.1 Allgemeiner Aufbau Standardreaktor

Das entwickelte Einweg-Photobioreaktor-System (siehe Abbildung 4.1) besteht aus einem Gehäuse und einem Klemmprofil. Das Gehäuse hat die Abmessungen Höhe 120 cm, Breite 90 cm, Tiefe 25 cm. In dem Gehäuse ist ein Heiz- und Kühlaggregat unterhalb einer Belichtungseinheit sowie ein Klemmprofil für die Bioreaktormatte untergebracht. Eine Begasungseinheit (Seliger, 2011) ist zusammen mit einer Luftbefeuchtungsflasche und Sterilfiltern (Sartorius-Stedim, 2011) ebenfalls an dem Gehäuse befestigt. Eine Fahr- schiene mit einem Sensorkopf ist unterhalb des Klemmprofils am Gehäuse angebracht. Das System verfügt über 25 identische verschweißte Reaktorschläuche (100 mL) (Hsin, 2006).

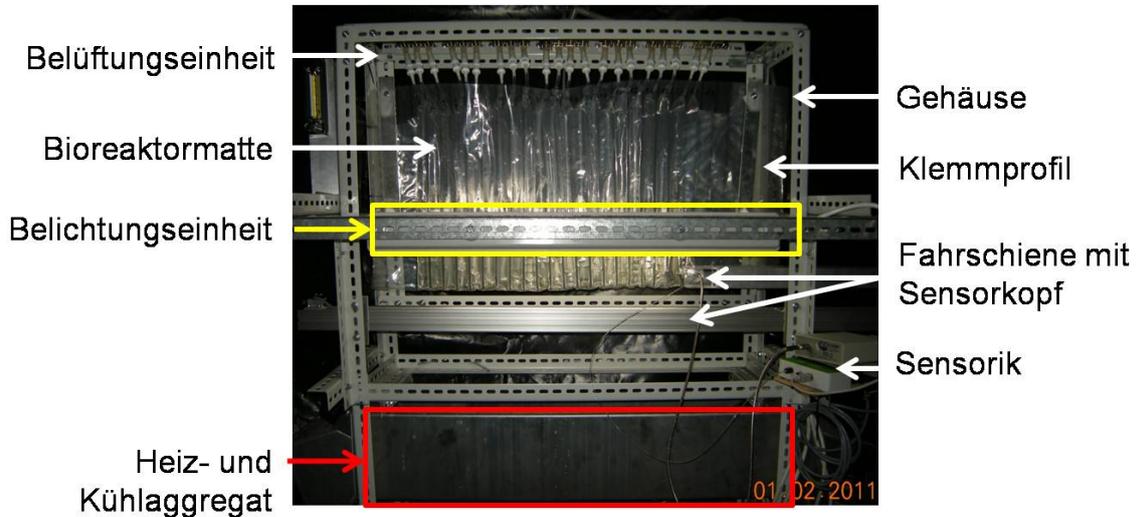


Abbildung 4.1: Frontfoto des entwickelten Screeningsystems

4.1.1.2 Allgemeiner Aufbau Wippreaktor

Die Abmessungen des entwickelten Wippreaktors (siehe Abbildung 4.2) betragen in der Höhe 180 cm, in der Breite 200 cm und in der Tiefe 120 cm. Ähnlich wie beim Standardreaktor ist ein Heiz- und Kühlaggregat unterhalb der Bioreaktormatte untergebracht. Die Bioreaktormatte wird bei diesem System nicht durch ein Klemmprofil befestigt, sondern liegt frei auf der Wippe. Bei diesem System können ebenfalls 25 identische Reaktorschläuche (100 mL) verwendet werden.

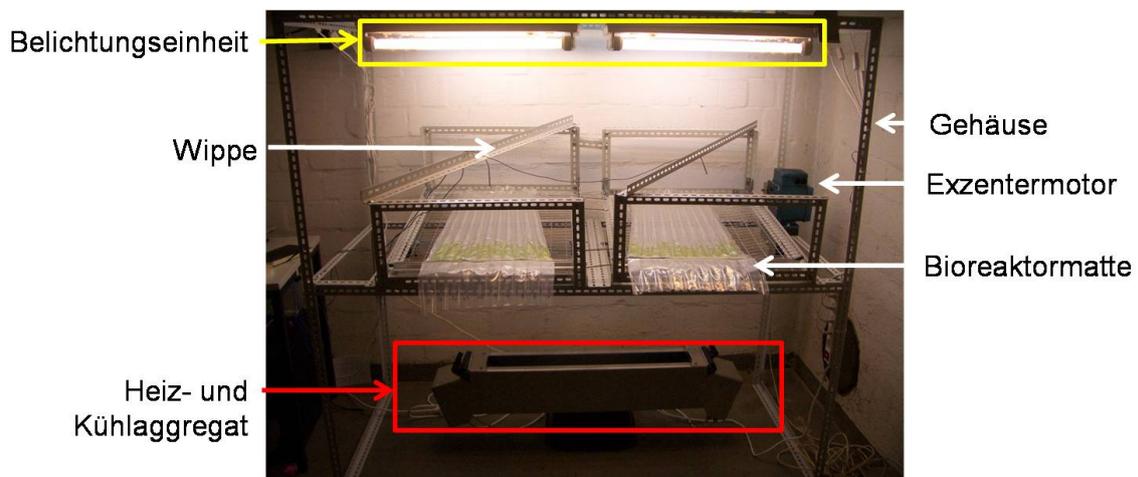


Abbildung 4.2: Frontfoto des zum Wippreaktor veränderten Screeningsystems

4.1.1.3 Material der Bioreaktormatte

Die in dem Einweg-Photobioreaktor-System verwendeten Bioreaktormatten bestehen aus Polyethylen (PE) mit einer Innenbeschichtung aus Ethylenvinylacetat (EVA). In der kommerziellen Anwendung werden diese Plastikmatten für die Verpackungsindustrie hergestellt. Das Luftbefüllventil dieser Plastikmatte ist durch ein Deutsches Patent (DE 20 2006 004 463 U1) geschützt. Dieses Ventil wurde bei den Versuchen nicht verwendet (Hsin, 2006).

4.1.1.4 Heiz- und Kühlaggregat

In dem Gehäuse ist ein Heiz- und Kühlaggregat (Selbstbau Biosystem- und Gartenbautechnik) unterhalb der Belichtungseinheit eingebaut. Das Heiz- und Kühlaggregat beinhaltet zwei Heizlüfter mit einer Anschlussleistung von jeweils 750 W und einer wasserbasierten Kühlung (siehe Skizze).

4.1.1.5 Belichtung

Die Belichtungseinheit ist oberhalb des Heiz- und Kühlaggregates an dem Gehäuseprofil befestigt. Diese hat einen Abstand von 10 cm zur Bioreaktormatte. Das Screeningsystem kann wahlweise mit zwei verschiedenen Belichtungsquellen ausgestattet werden. Zum einen können Philips-Leuchtstofflampen des Typs Philips Master TL-D 58W/840 cool-white (Philips Deutschland GmbH, Hamburg) zum anderen LUXEON Rebel Leuchtdioden der Firma Philips (San Jose, USA) verwendet werden.

Um beide Arten von Lichtquellen vergleichen zu können, wurden sie nach der Qualität des emittierten Lichts ausgewählt. Es handelte sich bei beiden Lichtquellen um „cool white“ Leuchtmittel, deren Emissionsmaxima im blauen Spektralbereich um 450 nm sowie im roten von circa 550 nm bis 600 nm liegen. In Abbildung 4.3 ist die spektrale Verteilung des Photonenflusses der beiden Lichtquellen dargestellt. Die Leuchtstofflampe hatte ihren maximalen Photonenfluss bei den Wellenlängen 430 nm, 540 nm und 630 nm. Die Leuchtdiode hatte Maxima im Bereich von 450 nm und 630 nm (Bornwasser, 2011). Gemessen wurden die Werte mittels Li-Cor Li-250A Quantenzähler (Li-Cor Biosciences, Lincoln, USA) für jeden Messpunkt innerhalb der Reaktorröhre. Die relative Lichtverteilung ergab sich, indem jeder Messwert prozentual auf den Sollwert bezogen wurde. Wie

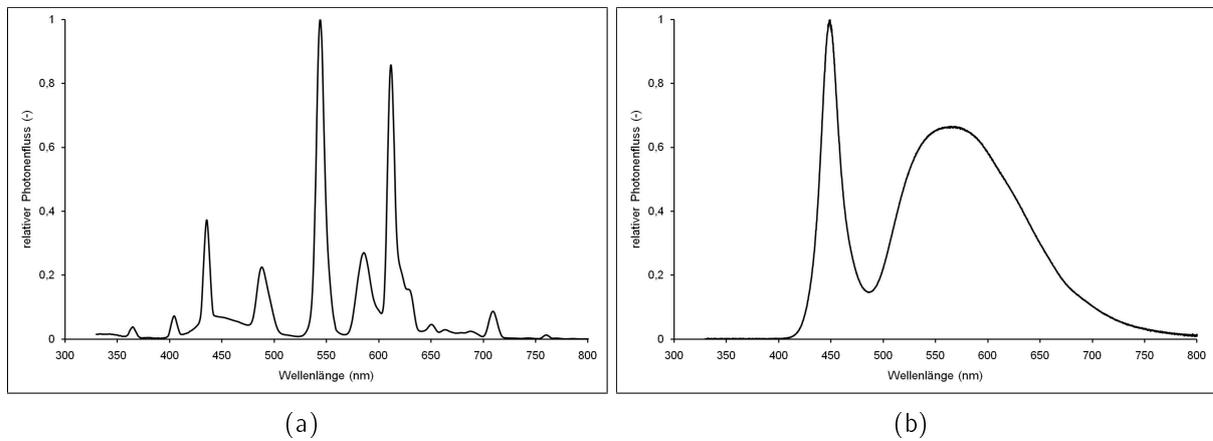


Abbildung 4.3: Spektraler Photonenfluss der Belichtungen mittels Leuchtstofflampe (a) und Leuchtdioden (b) über den sichtbaren Wellenlängenbereich (verändert nach Bornwasser, 2011)

in Abbildung 4.4 zu erkennen ist, war die Verteilung der Photosynthetischen Photonenflussdichte bei der Belichtung mittels Leuchtdioden gleichmäßig und variierte nur gering mit einer mittleren Abweichung von 3 %. Bei der Belichtung mittels Leuchtstofflampe variierte die PPFd stark mit einer mittleren Abweichung von 22 %.

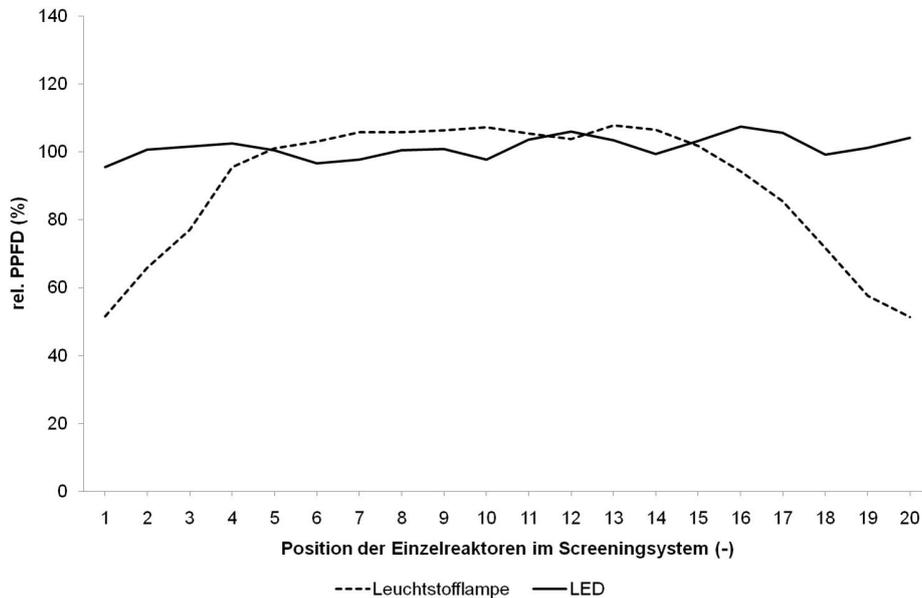


Abbildung 4.4: Relative Verteilung der Photosynthetischen Photonenflussdichte (PPFD) im Screeningsystem bei einer Belichtung mittels Leuchtstofflampe und Leuchtdioden (LED). Die relative PPFD bezieht sich auf den eingestellten Sollwert

4.1.2 Sensorik

4.1.2.1 Eingesetzte Sensoren

In dem verwendeten Einweg-Photobioreaktor-System wurden folgende Sensoren verwendet:

- Die Kulturtemperatur wurde mittels NTC-Fühlern (Thermokon, Mittenaar) gemessen.
- Die Chlorophyllfluoreszenzmessung wurde mittels Junior-PAM (Walz, Effeltrich) ermittelt.
- Absorptionsspektren wurden mit Hilfe des USB-4000-Spektrometers (Ocean Optics, USA) aufgenommen.

4.1.2.2 Sensorschiene der Sensorik

Zur Bewegung der Sensorik wurde eine Sensorschiene eingesetzt. Bei der Sensorschiene handelte es sich um eine Laufschiene der Firma Igus (Köln, Deutschland), welche mit Hilfe der Software ProfiLab-Expert bedient wurde. Als mobiles Element diente ein

Schlitten, welcher durch einen Gummiriemen auf einer Schiene bewegt wurde. Auf diesen Schlitten war der Messkopf auf einer Zange montiert und beinhaltete die Sensoren der photosynthetische Aktivität und der Absorptionsspektren.

4.1.2.3 Steuerung und Regelung der Sensorik

Für die Regelung der Kulturführungsparameter Belichtung, Begasung, Temperatur, sowie für die Erfassung der Messdaten wurde ein LabJack U12 (Fa. LabJack Corporation, USA) mit der Software ProfiLab-Expert (Fa. Abacom, Ganderkesee) verwendet. Durch einen Soll-Ist Vergleich der ProfiLab-Expert-Software wurde die Temperatur durch das kombinierte Heiz- und Kühlaggregat unterhalb der Bioreaktormatte geregelt. Durch die direkte Eingabe der Solltemperatur auf der ProfiLab-Expert-Oberfläche, konnte jede gewünschte Temperatur eingestellt werden. Die Prinzipskizze der Sensoren und des LabJack U12 ist in Abbildung 4.5 dargestellt.

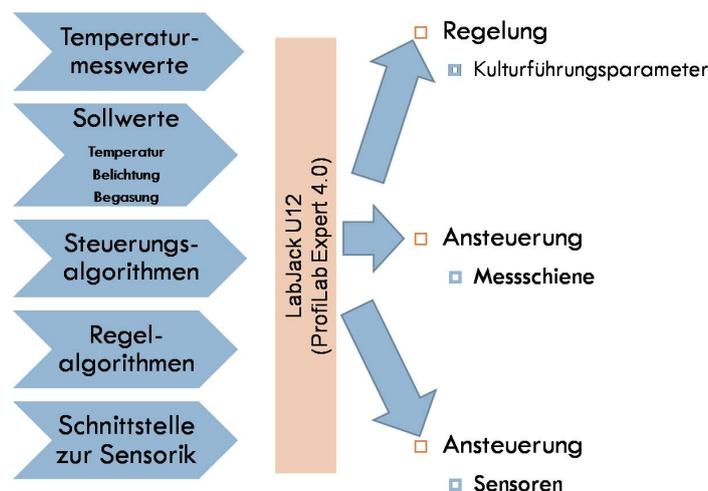


Abbildung 4.5: Schnittstelle der ProfiLab-Software für die Regelung der Kulturführungsparameter und die Datenerfassung mittels LabJack U12

Weiterhin wurde mit Hilfe der Software ProfiLab-Expert und dem LabJack U12 die Belichtungsregelung über einen Timer, die Temperaturregelung zwischen Sollwerten sowie die Steuerung der Antriebsschiene mit Fahrtrichtungswechsel für den Messkopf geregelt. Die Steuerung der Kulturführungsparameter erfolgte mittels eines ProfiLab-Expert-Makros, welches speziell entwickelt wurde. Dieses Makro wurde auch in anderen

Arbeiten verwendet (Fuljahn, 2010). Für die Steuerung der Sensorschiene wurde ein ProfiLab-Expert-Makro verwendet, welches einen Schrittmotor (Fa. Sanyo Denki mit RN-Stepp 297, Brall Software) und einen Funktionsgenerator (Fa. TTI, TG330) mittels eines Messprotokolls steuerte. Der Funktionsgenerator diente als Taktgeber für den Antrieb der Sensorschiene durch den Schrittmotor.

Die Steuerung des Junior-PAM (Fa. Walz, Effeltrich) wurde über eine Verbindung zwischen ProfiLab-Expert und WinControl, der Software für die Steuerung des Junior-PAM (Walz, Effeltrich), hergestellt. Die Verbindungen zwischen den Windows-Anwendungen konnten mit Hilfe eines dynamischen Datenaustausches (DDE) realisiert werden. Für die DDE-Konversation musste eine DDE-Client-Anwendung und eine DDE-Server-Anwendung definiert werden. Innerhalb der ProfiLab-Expert Anwendung konnte so auf alle Funktionen des Junior-PAM Messgerätes zugegriffen werden. Die Messergebnisse wurden über diese Schnittstelle visualisiert und abgespeichert.

4.2 Systemvergleich

4.2.1 Allgemeines

Bei dem Systemvergleich wurden verschiedene Reaktortypen mit dem neu konzipiertem Screeningsystem verglichen. Für den Vergleich wurden Kulturflaschen (nicht belüfteter Erlenmeyerkolben 100 mL), Mikrotiterplatten (96 Well-Platte), Reaktorbeutel (geschlossener und nicht belüfteter Bioreaktorbeutel) und der neu konzipierte Mattenreaktor (siehe Tabelle 4.1) eingesetzt.

Tabelle 4.1: Verwendete Photobioreaktoren für den Systemvergleich
Photobioreaktorsysteme

	Reaktorbeutel	Mikrotiterplatte	Kulturflasche	entwickeltes Screeningsystem
Eigenschaften				
Reaktortyp	Schüttelreaktor	Schüttelreaktor	Schüttelreaktor	Airliftreaktor
Reaktormaterial	Bioreaktormatte	Polypropylen	Glas	Bioreaktormatte
Volumen [L]	0,1	0,0002	0,1	0,1
Kultivierungs- dauer [Tage]	28	8	28	28
Hersteller	(Hsin, 2006)	Carl Roth	Schott Duran	(Hsin, 2006)

4.2.2 Algenspezies

Für die Vergleichsuntersuchungen wurde *Chlorella vulgaris* (211-11) als Referenzalge kultiviert. Die Kultur wurde von der Experimentellen Phykologie und Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen bezogen (SAG, 2010).

4.2.3 Kulturmedien

In den Experimenten wurde bei der „Kontrollvariante“ ein „Dünger-Medium“ als Standard eingesetzt. Hierbei handelte es sich um destilliertes Wasser mit einem Anteil von 20 $mL L^{-1}$ reinem Flüssig-Grünpflanzendünger des Herstellers Max Bahr (Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2: Zusammensetzung des Flüssig-Grünpflanzendüngers vom Hersteller Max Bahr

Element	Volumenanteil in mL ⁻¹
N	70
P ₂ O ₂	50
K ₂ O	60
MgO	4
S	10
B	0,1
Cu	0,02
Fe	0,2
Mn	0,1
Mo	0,01
Zn	0,02

4.2.4 Transmissionsmessungen

Die Transmissionseigenschaften der verwendeten Materialien bei den unterschiedlichen Reaktortypen wurden mit Hilfe eines Perkin Elmer 900 Spektrometers ermittelt. Gemessen wurde das einfache flache Reaktormaterial im Wellenlängenbereich von 300 nm bis 2500 nm.

4.2.5 Berechnung der Wachstumsraten

Die spezifische Wachstumsrate wurde nach einer einfachen Wachstumsfunktion berechnet (Levasseur et al., 1993; Jiang et al., 2011):

$$X_t = e^{\mu t}$$

Bei Berücksichtigung eines Startwertes gilt:

$$X_t = X_0 + e^{\mu(t-t_0)}$$

$$X_t - X_0 = e^{\mu(t-t_0)}$$

$$\ln(X_t - X_0) = \mu(t - t_0)$$

$$\mu = \frac{\ln(X_t - X_0)}{t - t_0} \quad (4.1)$$

mit:

μ : spezifische Wachstumsrate (d^{-1})

X_t : Zellzahl am Ende der exponentiellen Phase (Zellen mL^{-1})

X_0 : Zellzahl am Anfang der exponentiellen Phase (Zellen mL^{-1})

t_0 : Beginn der exponentiellen Phase (d)

t : Ende der exponentiellen Phase (d)

Bei den Validierungsversuchen wurden für den Beginn und das Ende der exponentiellen Phase feste Zeitpunkte angenommen.

4.3 Systemvalidierung anhand von Screeningbeispielen

4.3.1 Einführung und Allgemeines

Die Funktionalität des Screeningsystems soll anhand von ausgewählten Experimenten aus den Bereichen Toleranzuntersuchungen von Mikroalgen gegenüber salinen Habitaten, Stoffstromanalysen in Mikroalgensuspensionen bei Nitrat- und Phosphatverlagerungen und Phäno- und Genotypisierung einer unbekanntes Algenspezies durchgeführt werden.

4.3.2 Toleranzuntersuchungen von Mikroalgen gegenüber salinen Habitaten

4.3.2.1 Einführung und Allgemeines

Besonders die Toleranz gegenüber Extremstandorten ist häufig eine wichtige wissenschaftliche Fragestellung. Deswegen wurde die Toleranz gegenüber salinen Habitaten untersucht. Bei Toleranzuntersuchungen wird analysiert, wie lange ein Organismus in einer Umgebung besteht, zwischen welchen Grenzwerten sich die typischen Eigenschaften eines Organismus ändern und welche quantitativen Auswirkungen dies für die an das Habitat angepassten Organismenpopulation hat. In diesem Teilbereich soll für das Screening-System überprüft werden, ob die Bioreaktormatte diesen extremen salinen Bedingungen standhält und wie sich abgestorbene Algenzellen verhalten. Als saline Habitats und Extremstandorte wurden Abwässer aus der Düngerproduktion gewählt.

Mikroalgen sind sehr oft in salinen Gewässern dieser Erde zu finden. Ein Beispiel, dass Mikroalgen in salinen Habitaten und an Extremstandorten überleben, ist an der Spezies *Dunaliella* zu erkennen. Sie hat eine beachtliche Salztoleranz und wurde erstmals 1931

beschrieben (Baas-Becking, 1931). Beobachtungen zeigen, dass die Mikroalge unter natürlichen Bedingungen in Gewässern mit einer Natriumchloridkonzentration von 1 bis 5 mol L⁻¹ wächst. Auch in einem pH-Wertbereich von 6 bis 11 ist ein Wachstum zu verzeichnen (Avron and Ben-Amotz, 1992), (Oren, 2010). *Dunaliella salina* toleriert unter natürlichen Bedingungen Temperaturen zwischen 8 und 35 °C und wächst optimal bei Temperaturen zwischen 14 und 30 °C (Gibor, 1956). 1964 konnten im Toten Meer *Dunaliella* Zelldichten von bis zu 40000 Zellen pro mL gezählt werden. Im Großen Salzsee dokumentierte man 1970 maximale Zelldichten von 30000 bis 100000 Zellen mL⁻¹ bei einem Gesamtsalzgehalt von 330 g L⁻¹ (Seckbach, 2007).

4.3.2.2 Algenspezies

Es wurden Mikroalgen verwendet, welche in der Literatur als tolerant gegenüber extrem halophilen Umweltbedingungen beschrieben wurden, siehe Tabelle 4.3 (Seckbach, 2007). Die limnische Alge *Chlorella vulgaris* (211-11) wurde als Kontrolle verwendet. Die Kulturen wurden von der Experimentellen Phykologie und Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen bezogen (SAG, 2010).

Tabelle 4.3: Verwendete Algenarten und Kulturmedien

Algenart	SAG- Nummer	Kulturmedium	Verwendung	Salztoleranz	Literatur
<i>Asteromonas gracilis</i>	(64.90)	Seawater	Fischfutter	ja	(Hotos, 2003)
<i>Dunaliella salina</i>	(184.80)	mod. Johnson	Kosmetika	ja	(Avron and Ben-Amotz, 1992)
<i>Arthrospira platensis</i>	(21.99)	Seawater	Nahrungsergänzung	ja	(Ohmori et al., 2008)
<i>Nannochloropsis salina</i>	(40.85)	Seawater	Lipidherstellung	ja	(Renaud and Parry, 1994; Barsanti and Gualtieri, 2006)
<i>Tetraselmis tetraethele</i>	(161-2c)	Seawater	Salinenkrebsfutter	ja	(Okauchi and Kawamura, 1997; Peña and Villegas, 2005)
<i>Tetraselmis marina</i>	(202.80)	Seawater	Fischfutter, Lipidherstellung		(Seckbach, 2007)
<i>Isochrysis galbana</i>	(13.92)	Seawater	Lipidherstellung	ja	(Renaud and Parry, 1994; Muhamad Shaleh, 2004)
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	(21.35)	Seawater	-	nein	(Brand, 1984)
<i>Stichococcus bacillaris</i>	(379-2)	Seawater	-	nein	(Kirst, 1990)
<i>Chlorella vulgaris</i>	(211-11)	Düngermedium	Nahrungsmittel	nein	(Fan et al., 2007)

4.3.2.3 Kulturmedium

Für die verwendeten Kulturen wurden die Kulturmedien mit destilliertem Wasser und Chemikalien der Hersteller Merck (Darmstadt, Deutschland) und Sigma-Aldrich (Seelze, Deutschland) nach den in Tabelle 4.4 und 4.5 abgebildeten Rezepten präpariert. Vor ihrer Verwendung wurden die frischen Medien bei 121 °C autoklaviert, um einen möglichst großen Schutz vor Kontaminationen zu gewährleisten. Wie in Tabelle 4.3 zu erkennen ist, wurde bei allen Kulturen bis auf *Dunaliella salina* und *Chlorella vulgaris* Seawater als Kulturmedium verwendet. Bei *Dunaliella salina* wurde das modified Johnson Medium (siehe Tabelle 4.4) und bei *Chlorella vulgaris* das Düngermedium (siehe Tabelle 4.2) verwendet.

Tabelle 4.4: Modified Johnson-Medium

Stoff		Menge	
NaCl		60 g/L	
MgCl ₂ * 6 H ₂ O		1,5 g/L	
MgSO ₄ * 7 H ₂ O		0,5 g/L	
KCl		0,2 g/L	
CaCl ₂ * 2 H ₂ O		0,2 g/L	
KNO ₃		1,4 g/L	
NaHCO ₃		0,043 g/L	
KH ₂ PO ₄		0,035 g/L	
Eisenlösung		10 mL/L	
Spurenelemente		10 mL/L	
dest. H ₂ O		980 mL/L	

Eisenlösung		Spurenelemente	
Stoff	Menge	Stoff	Menge
<i>Na₂EDTA</i>	0,189 g/L	<i>H₃BO₃</i>	0,061 g/L
<i>FeCl₃ * 6H₂O</i>	0,244 g/L	<i>(NH₄)₆Mo₇O₂₄</i>	0,038 g/L
		<i>CuCl₂ * 5H₂O</i>	0,006 g/L
		<i>CoCl₂ * 6H₂O</i>	0,0051 g/L
		<i>ZnCl₂</i>	0,0041 g/L
		<i>MnCl * 4H₂O</i>	0,0041 g/L
		ph-Wert auf 7,5 einstellen	

Die untersuchten Salzstress-Varianten wurden durch den Austausch von destilliertem Wasser mit salzhaltigem Abwasser erzeugt. Das verwendete Abwasser stammte aus der Kaliproduktion der K+S AG, Kassel und hatte folgende Salzgehalte: NaCl (122 g L⁻¹), KCl (37 g L⁻¹), MgCl₂ (58 g L⁻¹). Die Wachstumsmedien wurden mit salzhaltigem Abwasser bis zu der entsprechenden Salzkonzentration aufgesalzen. Der Gesamtsalzgehalt der einzelnen Varianten ist in Tabelle 4.6 dargestellt. Es wurden fünf verschiedene

Tabelle 4.5: Seawater-Medium

Stoff	Menge
NaCl	60 g/L
KCl ₂	1,5 g/L
CaSO ₄	2 g/L
KNO ₃	0,1 g/L
MgSO ₄ *7H ₂ O	10 g/L
K ₂ HPO ₄	0,1 g/L
Bodenextrakt, siehe unten	15 mL/L
Mikronährstoffe, siehe unten	2,5 mL/L
dest. H ₂ O	982,5 mL/L

Mikronährstoffe (1 L)

Stoff	Stammlösung	Medium
ZnSO ₄ *7H ₂ O	0,1 g/100 mL	1 mL/L
MnSO ₄ *4H ₂ O	0,1 g/100 mL	2 mL/L
H ₃ BO ₃	0,2 g/100 mL	5 mL/L
Co(NO ₃) ₂ *6H ₂ O	0,02 g/100 mL	5 mL/L
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0,02 g/100 mL	5 mL/L
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,0005 g/100 mL	1 mL/L
destilliertes H ₂ O		981 mL
FeSO ₄ *7H ₂ O		0,7 mL/L
EDTA (Titriplex III)		0,8 mL/L

Bodenextrakt (1 L)

Für die Herstellung von 1 L Bodenextrakt muss 2 L herkömmlicher Boden in ein Gefäß gegeben und mit destilliertem Wasser bis 5 cm oberhalb des Bodens aufgefüllt werden. Das Gemisch wird innerhalb von 24 Stunden zwei Mal für eine Stunde autoklaviert und anschließend filtriert.

Abwasserkonzentrationen getestet: 0 % (Kontrolle), 12,5 %, 25 %, 50 % und 75 % (LL^{-1}) (bezogen auf das Volumen des Kulturmediums). Tabelle 4.6 stellt die daraus resultierenden Salzgehalte tabellarisch dar.

Tabelle 4.6: Salzkonzentration und Abwasseranteil in Wachstumsmedien

Grundmedium	Anteil des Abwassers im Wachstumsmedium [% (LL^{-1})]				
	0	12,5	25	50	75
	Salzkonzentration im Wachstumsmedium [$g L^{-1}$]				
Seawater	61	92	123	186	249
modified Johnson	62	93	124	187	249
Düngermedium	61	54	93	171	249
destilliertes Wasser	61	54	93	171	249

4.3.2.4 Salzanalytik

Die Salzanalytik wurde mit einem optischen Emissionsspektrometer mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES) durchgeführt. Um den intrazellulären Magnesiumgehalt zu bestimmen, wurden die Algen lyophilisiert und anschließend mittels ICP-OES analysiert. Natrium- und Kaliumgehalt wurden mittels Flammenphotometer (FPM) bestimmt, um eine Interferenz der Emission, verursacht durch hohe Plasmatemperaturen des ICP-OES, zu vermeiden (Robinson et al., 2005). Für beide Methoden wurden 50 mg der Proben für 12 Stunden bei 480 °C verascht. Nach der Abkühlung wurde 1 mL Salpetersäure (1:3) hinzugegeben. Nach weiteren 10 Minuten wurden 9 mL destilliertes Wasser hinzugegeben und die Probe im Anschluß gefiltert.

4.3.2.5 Datenanalyse

Die Datenanalyse wurde mittels Linearer Regressions-Modelle mit Hilfe der Statistik Software R durchgeführt (R, 2006). Da in der Wachstumsphase für einen gewissen Zeitabschnitt ein lineares Wachstum unterstellt werden konnte wurden für diesen Zeitraum lineare Modelle genutzt um einen salzgehaltabhängigen Wachstumsvergleich während der Wachstumsphase zu zeigen. Dies wurde mit Hilfe der Funktion 'lm' des Packetes 'stats' errechnet (R, 2006).

4.3.2.6 Durchführung der Experimente

Die Versuche wurden in dem neu entwickelten Einweg-Photobioreaktor durchgeführt. Die Salztoleranz der Mikroalgen wurde dabei mit zwei verschiedenen Versuchsansätzen untersucht: (i) Salzschockexperimente und (ii) Aufsalzungsexperimente.

(i) Salzschockexperimente:

Für die Salzschockexperimente wurden die Mikroalgen zunächst in „Seawater-Medium“ kultiviert, bevor die gewünschte Salzkonzentration im Kulturmedium eingestellt wurde. In parallelen Versuchen wurden die Effekte von Temperatur, Belichtung und Abwasserkonzentration auf das Algenwachstum untersucht. Die Temperaturvarianten betragen 23 °C und 30 °C, die PPFD $15 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ und $37 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. In jeder Variante wurden vier verschiedene Wachstumsmedien angewendet. Die Anzahl der Wiederholungen pro Variantenkombination war zwei. Jedes Wachstumsexperiment dauerte 10 Tage. In den Experimenten wurde die Populationsdichte am Anfang auf 15×10^6 Zellen mL^{-1} vereinheitlicht. Dies ermöglichte die Messung der Salzeffekte auf die Wachstumsphase (maximale Wachstumsrate).

(ii) Aufsalzungsexperimente:

Die Aufsalzungsexperimente wurden in 100 mL Erlenmeyerkolben auf einem Schüttler (100 min^{-1}) durchgeführt, da eine tägliche Aufsalzung in dem neu entwickelten Einweg-Photobioreaktor zu dem Zeitpunkt noch nicht realisierbar war. Die getesteten Kulturen wurden anhand der Ergebnisse des vorherigen Schockexperimentes ausgewählt. Es wurden die Kulturbedingungen gewählt, welche ein maximales Wachstum bei größtmöglichem Salzanteil zeigten (23 °C und $37 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPFD). Die Anzahl der Wiederholungen pro Variantenkombination war zwei. Die Kultur der Algenarten wurde vergleichend zum Salzschockexperiment kultiviert. Im Abstand von zwei Tagen wurde der Salzwasseranteil des Wachstumsmediums von 0 % (Kontrolle) auf 90 % (LL^{-1}) um 10 % (LL^{-1}) erhöht. Ebenso wurde die Biomassekonzentration der Algensuspension bestimmt. Insgesamt wurden die Mikroalgen in diesen Experimenten 30 Tage kultiviert.

Die Biomassekonzentration während der Kulturdauer wurde durch die Messung der optischen Dichte (Extinktion) bei 850 nm bestimmt. Die Kalibrierung der Extinktionsmessungen wurde mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer durchgeführt. Für die Umrechnung von der Extinktion auf Zellen pro mL wurde eine lineare Umrechnungsfunktion bestimmt.

Die Kultivierung von *D. salina* wurde in beiden Experimenten (i und ii) in einem Wippreaktor ohne Begasung durchgeführt. In diesem System wurden die gleichen Einwegmatten verwendet, die auch im neu entwickelten Screening-System verwendet wurden. Größe und Volumen waren jeweils identisch, lediglich eine Begasung der Algensuspension wurde nicht durchgeführt. Die dadurch resultierende geringere Kohlendioxidkonzentration in dem geschlossenen Wippreaktor wurde durch die kurze Wachstumsperiode und durch die Zugabe von einem Carbonatpuffer (Ammoniumcarbonat 345 mg L⁻¹) ausgeglichen.

4.3.3 Stoffstromanalysen in Mikroalgensuspensionen bei Nitrat- und Phosphatverlagerungen

4.3.3.1 Einführung und Allgemeines

Ein wichtiges Kriterium für die Funktionalität eines Screeningreaktors ist die Einsetzbarkeit unter nicht sterilen und mikrobiologisch belasteten Medien. Besonders die Sensorik und die mögliche Auswertbarkeit der Sensorikdaten ist dabei von Bedeutung. Zur Überprüfung dieser wichtigen Kriterien wurde ein Abwasserscreening bezüglich wichtiger Nährstoffe (Nitrat und Phosphat) durchgeführt.

Seit 50 Jahren wird im Bereich Abwasserreinigung durch Mikroalgen geforscht (Oswald and Golueke, 1960; Oswald et al., 1978; Tam and Wong, 1989, 1990; Lau et al., 1995; Woertz et al., 2009; Li et al., 2011). Diese Studien beinhalten Behandlungen von Abwasser in verschiedenen Stadien des Reinigungsprozesses einer Kläranlage mit Mikroalgen. Die Abwässer sind zum Beispiel Belebtschlämme, Faulschlämme, Abflüsse aus Nachklärbecken, industrielle Abwässer sowie Haushaltsabwässer. Eine Zusammenfassung dieser Arbeiten gibt Tabelle 4.7 wieder. Die meisten Studien beschäftigen sich mit Süßwasseralgen wie *Chlorella vulgaris*. Da verfügbare Wasserressourcen zum größten Teil in den Meeren als Salzwasser zu finden sind, hätte eine Abwasserbehandlung mit marinen Mikroalgen den Vorteil, dass diese auch in salinen Abwässern überleben und dass hierdurch bei einer nötigen Verdünnung nicht mit Trinkwasser gearbeitet werden müsste. Die Organismen in salzhaltigen Gewässern sind zudem besser an extreme Habitats angepasst.

Tabelle 4.7: Vergleichende Untersuchungen zu Stoffstromanalysen in Mikroalgensuspensionen bei Nitrat- und Phosphatverlagerungen

Organismen	Abwasser	Analysen			Kulturdauer (d)	Quelle		
		limnische	marine	P			NO ₃ ⁻	weitere
<i>Chlorella</i> sp.	Haushalts-abwässer			X	NH ₄ , N, CSB	14	(Li et al., 2011)	
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Belebt- und Faulschlamm			X	N	11	(Cheung and Wong, 1981)	
<i>Chlorella</i> sp.	vorgeklärtes Haushalts-abwasser			X	X	NH ₄ , CSB	10	(Lau et al., 1995)
<i>Chlorella</i> sp.	geklärtes Abwasser aus dem Nachklärbecken			X		N	18	(Woertz et al., 2009)
<i>Botryococcus braunii</i>	vorgeklärtes Haushalts-abwasser			X		NH ₄ , NO ₂	10	(Sawayama et al., 1992)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	vorgeklärtes Haushalts-abwasser			X	X	NH ₄	6-10	(Tam and Wong, 1989, 1990)
<i>Scenedesmus</i> sp.	vorgeklärtes Haushalts-abwasser			X	X	NH ₄	6-10	(Tam and Wong, 1989, 1990)
<i>Botryococcus braunii</i>	vorgeklärter Schweineflüssigmist			X		NH ₄ , N	12	(An et al., 2003)
<i>Phormidium bohneri</i> (Cyanobakterium)	Fischfarm-abwasser			X	X	N, CSB	27	(Dumas et al., 1998)
<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Scenedesmus dimorphus</i>	vorgeklärter Schweineflüssigmist			X	X	NH ₄	9	(Gonzalez et al., 1997)
<i>Scenedesmus intermedius</i>	Bolds Basal Medium			X		NH ₄ N	10	(Jimenez-Perez et al., 2004)
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Bolds Basal Medium			X		NH ₄ N	10	(Jimenez-Perez et al., 2004)
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Haushalts-abwässer, Sea-water Medium					Lipide	10	(Jiang et al., 2011)

Aufgrund steigender Bevölkerungsdichten und der Industrialisierung treten besonders in Entwicklungsländern immer häufiger Probleme auch mit herkömmlichen Haushaltsabwässern auf. Kläranlagen in Entwicklungsländern fehlen häufig biologische Reinigungsstufen. Durch die Nachbehandlung von Haushalts- und Industrieabwässern kann verhindert werden, dass eine hohe Menge an Nährstoffen, besonders Phosphat und Nitrat, direkt in die Umwelt gelangt. Dies verhindert eine Eutrophierung von Flüssen, Seen und Meeren (Lau et al., 1995; Trépanier et al., 2002) und eine direkte Verschmutzung der Trinkwasser-Ressourcen im großen Maßstab (Montaigne, 2002). Neben diesen Gesichtspunkten ist eine Rückgewinnung von Phosphaten und Nitraten ebenfalls von Interesse. Mikroalgen können bei der Abscheidung dieser beiden Nährstoffe einen Beitrag leisten (Di Termini et al., 2011).

Ziel des Teilbereiches dieser Arbeit war die Einsetzbarkeit des Reaktorsystems für die Abwasserreinigung. Der spezielle Fokus lag hier bei der Sensorik. Weiterhin sollten die Wachstumsraten, Biomassekonzentrationen, photosynthetische Aktivitäten und das Reinigungspotential im Hinblick auf Nitrat und Phosphat erarbeitet werden. Ferner sollte bei Vorhersagemodellen bezüglich der Phosphat- und Nitratgehalte mittels spektrometrischen Methoden (Extinktion) entwickelt werden, um ein in-situ Screening zu ermöglichen.

4.3.3.2 Algenspezies und Kulturmedium

Bei der Untersuchung der Stoffströme von Phosphat und Nitrat in Abwässern wurde *Nanochloropsis salina* (40.85) in Seawater-Medium vorkultiviert. Die Kultur wurde von der Experimentellen Phykologie und Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen, bezogen (SAG, 2010)

Die Abwasserproben stammten aus einer Kläranlage für herkömmliche Haushaltsabwässer der VIT University, Vellore, Tamil Nadu, Indien. Die Abwasserproben wurden nach der mechanischen Reinigungsstufe entnommen und für die Versuche bei 4 °C gelagert, damit Abbauprozesse bakterieller Art vermindert wurden.

4.3.3.3 Phosphatanalyse

Bei dieser Methode bildet Ammoniumheptamolybdat mit dem Phosphat einen Komplex, der durch das Sulfit zu Molybdänblau reduziert wird. Das Hydrochinon unterbindet dabei die Polymerisation der Molybdate. Die Intensität der Molybdänblaufärbung ist

proportional zum komplexgebundenen Phosphat. Für die Analyse wurden zunächst drei Stammlösungen angesetzt.

Lösung A: 0,825 g Ammoniumheptamolybdat gelöst in 17,5 mL destilliertem Wasser und 12,5 mL Schwefelsäure (3,75 M).

Lösung B: 0,75 g Eisen(II)-Sulfat, 12,35 mL destilliertes Wasser und 0,15 mL Schwefelsäure (3,75 M).

Kalibrierlösung: Für die Erstellung der Kalibrierfunktion wurde eine 10 mM Natriumdihydrogenphosphat-Stammlösung erstellt.

Für die Messung wurden 1,5 mL der gefilterten Probe mit 1,2 mL von Lösung A und 0,6 mL von Lösung B vermischt. Nach 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde im Anschluss die Extinktion bei 546 nm gemessen. Als Referenz diente destilliertes Wasser. Zur Erstellung der Kalibrierfunktion wurde als Stammlösung 10 mM Natriumdihydrogenphosphat benutzt. Die Daten wurden mit Hilfe eines Modellansatzes von Fiske and Subbarow (1925) ausgewertet. (Vereinfachung nach Homeyer et al. (1989)).

4.3.3.4 Nitratanalyse

Die Vor-Ort-Nitratanalyse wurde nach Perkampus (1986) und Kölle (2001) durchgeführt. Natriumsalicylat reagiert mit Nitrat-Ionen in einem saurem Milieu durch die Zugabe von Schwefelsäure zu Nitrosalicylsäure. Durch Zugabe von alkalischer Seignettesalzlösung wird das Medium basisch und es entsteht gelbes Nitrosalicylat. Ähnlich wie bei der Phosphatbestimmung erzeugt hier die Nitrosalicylatkonzentration die konzentrationsabhängigen Färbungen. Die Auswertung der Daten erfolgt in gleicher Weise wie bei der Phosphatanalyse.

4.3.3.5 Chlorophyll-Fluoreszenzmessung

Für die Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz der Algensuspension wurde das Chlorophyll-Fluorometer Junior-PAM (Walz, 2011) eingesetzt. Die photochemische Aktivität des Photosystems II (PS II) wurde durch die maximale Quantenausbeute des PS II nach einer Dunkeladaption von 15 Minuten gemessen:

$(F_m - F_0)/F_m = F_v/F_m$: maximale Quantenausbeute des PS II (-)

F_0 : Grundlevel der Chlorophyll-Fluoreszenz (-)

F_v : variable Chlorophyll-Fluoreszenz (-)

F_m : maximale Chlorophyll-Fluoreszenz (-)

4.3.3.6 Datenanalyse

Zur Feldanalyse der Daten wurde die Korrelation der Extinktionspektren mit den Nitrat- und Phosphatgehalten (Laborwerte) berechnet und in ein Vorhersagemodell bezüglich Phosphat- und Nitratgehalte überführt.

In Tabelle 4.8 ist der Aufbau eines Datensatzes dargestellt, welcher aus den Messungen des Nitrat- und Phosphatgehaltes sowie den dazugehörigen Absorptionspektren resultierte. Jede Datensatznummer bzw. jede Zeile im Datensatz spiegelte eine separate Messung wieder. Die Spalten Phosphat und Nitrat gaben die Vor-Ort-Messergebnisse der Nitrat- und Phosphatgehalte wieder. In allen weiteren Spalten wurde das Absorptionspektrum wellenlängenspezifisch (Wellenlängenbereich: 340 bis 860 nm) dargestellt. Für die Bestimmung der Nitrat- und Phosphatgehalte mittels Absorptionspektren im Wellenlängenbereich von 350 nm bis 860 nm wurde der Datensatz in einen Lern- und einen Testdatensatz aufgeteilt.

Der Lerndatensatz wurde zufällig aus dem gesamten Datensatz ausgewählt. Der Lerndatensatz hatte 104 Datenzeilen und beinhaltete 74 % der Gesamtdaten. Die zufällig nicht gewählten Daten bilden den Prüfdatensatz mit 36 Datenzeilen.

Die gemessenen Spektraldaten des Lern- bzw. Prüfdatensatzes wurden mit dem Statistikprogramm R (R, 2006) verarbeitet und ausgewertet. Nach Einlesen der Daten wurde sie über den jeweiligen Spaltenmittelwert normiert. Im Anschluss wurde der Savitzky-Golay Filter mit der 1. Ableitung angewendet. Als weiterer Verarbeitungsschritt wurde die

Tabelle 4.8: Datensatz der Nitrat- und Phosphatgehalte und deren Absorptionsspektren

Datensatz-Nummer	Phosphat mM	Nitrat mM	Absorption bei Wellenlänge (nm)			
			350	351	860
1	0.198	0.668	0.120	0.120	0.082
2	0.143	0.476	0.171	0.171	0.101
3	0.209	1.932	0.134	0.134	0.901
.....					
139	0.102	0.393	0.969	0.969	0.707
140	0.027	0.345	1.167	1.166	0.778

Orthogonale-Signal-Korrektur ¹ gewählt. Nach diesen Vorverarbeitungsschritten wurde eine „Partial Least Squares Regression“ (PLSR) ² mit Hilfe der Funktion „pls“ angewendet. Eine zusätzliche Validierung wurde über das „Leave one out“ Prinzip realisiert. Um eine optimale erklärte Varianz mit der Funktion RandomForrest zu erreichen, wurden die Vorverarbeitungsschritte getrennt angewendet. Eine Kombination der drei Vorverarbeitungsschritte wurde nicht durchgeführt (R, 2006).

¹Die Orthogonale Signal Korrektur (OSC) ist eine Datenvorverarbeitungstechnik, die Informationen entfernt, die nicht mit der gewählten Zielvariable korrelieren. Sie wurde von Wold et al. (1998) eingeführt, um die systematische Varianz der Spektraldaten die unkorreliert oder orthogonal zur Zielgröße sind, zu untersuchen. Die Technik basiert auf einer Hauptkomponentenanalyse (PCA). Da durch experimentelle Fehler die Relation der Hauptkomponenten zueinander gestört werden kann, werden durch den OSC Filter die unkorrelierten Informationen entfernt und die Struktur der Hauptkomponenten verbessert.

²Partial Least Squares ist eine in der Chemometrik oft genutzte Regressionsmethode. Das Prinzip der multivariaten Kalibrierung ist die simultane Benutzung unabhängiger Variablen x_1, \dots, x_n um eine oder mehrere abhängige Variablen y_1, \dots, y_n zu quantifizieren. Die Methode basiert auf der Zerlegung einer latenten Variable die in Relation zu zwei Variabelblöcken steht, die Spektrale aber auch Zielgrößen beinhalten. Durch eine multivariate Kalibrierungsmethode wie Partial Least Squares (PLS) Regression ist es möglich, ein Modell adjustiert zu einer Zielvariable zu erstellen (Wold et al., 1998).

4.3.4 Phäno- und Genotypisierung einer unbekanntes Algenspezies

4.3.4.1 Einführung und Allgemeines

Bei wissenschaftlichen Untersuchungen sind in vielen Fällen die Organismen nicht bekannt. Aus diesem Grund wurde eine Untersuchung durchgeführt, um eine unbekanntes Mikroalge mit Hilfe des Screeningsystems zu Geno- und Phänotypisieren (Goering, 2000). Durch ein phänotypisches Verfahren wird die Charakterisierung eines Organismus auf der Grundlage seines momentanen Erscheinungsbildes erstellt. Verschiedene Methoden können als Grundlage für die Phänotypisierung eingesetzt werden, wie beispielsweise Wachstumsparameter, elektronenmikroskopische Aufnahmen, biochemische Eigenschaften usw. Ein Nachteil der phänotypischen Verfahren basiert auf der teilweise stark variablen Expression der Gene, deren Genprodukte für die Phänotypisierung herangezogen werden (Arbeit, 1995). Beispielsweise kann eine Veränderung der Kulturparameter die Expression von vielen Genen und dadurch auch den Phänotyp beeinflussen (Nazarowec-White and Farber, 1999). Diese Variationen lassen sich durch standardisierte Kulturbedingungen verringern aber nicht komplett ausschließen. Ein weiterer Nachteil ist die reduzierte Differenzierbarkeit von Mikroorganismen durch eine phänotypische Methode (Dünnebier, 2006).

Bedingt durch die Nachteile bei phänotypischen Verfahren ergibt sich ein Bedarf an weiteren Methoden für die Charakterisierung von Organismen. Seit den 80er Jahren wurden aus diesem Grund molekularbiologische Verfahren entwickelt und eingesetzt um diesen Bedarf zu decken (Schaberg et al., 1981). Diese Verfahren dienen der Beschreibung des Genotyps eines bestimmten Organismus. In dem Genom werden alle Charakteristika beschrieben, welche in der genomischen DNA niedergelegt sind (Goering, 2000). Für eine genotypische Einordnung von Mikroalgen sind ribosomale RNAs (rRNA) sowie ihre kodierenden Gene (rDNA) gut geeignet. Die rRNAs bilden zusammen mit weiteren Proteinen die Ribosomen, welche die Proteinsynthese aus der DNA verantwortlich sind. Die Gene sind daher in allen Lebewesen stark konserviert und lassen sich so für phylogenetische Studien universell nutzen. Die hoch konservierten Sequenzbereiche der rRNAs bieten einen großen Vorteil in phylogenetischen Studien. Die Sequenzen in den konservierten Bereichen blieben über viele Generationen und Organismengruppen unverändert, so dass das Amplifizieren der rDNA mittels universeller PCR-Primer möglich ist. In der Literatur wird häufig mit der Sequenz der 18S rRNA gearbeitet. Mit Hilfe der Sequenz der 18S rRNA und universellen Primern konnten Sequenzen von Arten gefunden werden, die zuvor noch

unbeschrieben waren (López-García et al., 2001; Moon-van der Staay et al., 2001).

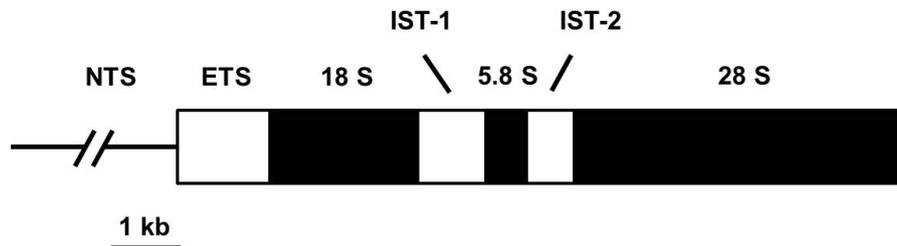


Abbildung 4.6: rDNA-Transkriptionseinheit (verändert nach Hillis and Dixon, 1991)

In Abbildung 4.6 ist eine rDNA-Transkriptionseinheit eines eukaryotischen Genoms dargestellt. Sie werden von NTS-Bereichen getrennt. Zwei ITS-Bereiche unterteilen die Gene für die 18S; 5,8 S und 28S -rDNA. Hiervor liegt der ETS-Bereich, welcher zu dem nicht-funktionalen Teil des Genoms gehört. Ein DNA-Abschnitt kann *in vitro* sehr stark mit einer Polymerasekettenreaktion (PCR) vermehrt und mittels Agarose-Gel-Elektrophorese getrennt und detektiert werden (Reinhard, 2010).

Die Nukleotid-Abfolge in einem DNA-Molekül wird durch eine DNA-Sequenzierung bestimmt. Seit 1995 konnte durch DNA-Sequenzierung das Genom von über 1000 (Stand: 2010) verschiedenen Organismen analysiert werden. Darüber hinaus ist die DNA-Sequenzierung als analytische Schlüsselmethod aus einem molekularbiologischen Laborbetrieb heute nicht mehr wegzudenken (Pettersson et al., 2009). Es gibt heute mehrere Verfahren zum Ablesen der Sequenzinformation von einem DNA-Molekül. Die Didesoxymethode nach Sanger stellt eine enzymatische Methode dar (Sanger et al., 1978). Eine Bestimmung von Organismen ist möglich, indem ein Sequenzvergleich der erhaltenen rDNA-Sequenzen mit bereits veröffentlichten Sequenzen durchgeführt wird. Hierfür stehen wiederum verschiedene Methoden zur Verfügung. Ein häufig benutzter Algorithmus zur Suche nach Sequenzähnlichkeiten ist der BLAST-Algorithmus. Dieses „Basic Local Alignment Search Tool“ geht auf bioinformatische Arbeiten am NCBI (National Center for Biotechnology Information) zurück (Altschul et al., 1990). Der Erfolg dieser Methode ist in der Geschwindigkeit begründet, in der die großen Datenmengen durchsucht werden (Knoop and Müller, 2008). Das Verfahren hat Grenzen, da durch die Bestimmung mit rDNA nur eine grobe Zuordnung möglich ist.

4.3.4.2 Wachstumsuntersuchungen

Für die Phänotypisierung wurden verschiedene Wachstumsraten bestimmt, wobei die spezifischen Wachstumsraten in den ersten neun Kultivierungstagen nach Formel 4.1 berechnet wurde.

4.3.4.3 Mikroskopische Untersuchungen

Bei den mikroskopischen Untersuchungen wurden lichtmikroskopische, sowie rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen verwendet. Die Aufnahmen wurden mit einem Lichtmikroskop bei 400-facher und 1000-facher-Vergrößerung gemacht. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen konnten im Laser Zentrum Hannover durchgeführt werden, wobei zwei verschiedene Methoden verwendet wurden (Mulisch, 2010; Rottmayr, 2001). Bei der ersten Methode wurde die Algensuspension direkt auf einen Objektträger gegeben und mit Gold in folgender Weise besputtert:

1. Auftragung der Algensuspension (50 % (LL^{-1}) K+S-Abstoßlösung) auf einen speziellen Objektträger
2. Trocknung mittels Raumluft (24 Stunden)
3. Besputterung (5000M, Polaron) mit Gold
4. Aufnahme im Rasterelektronenmikroskop (Quanta 400FE, FEI)

Bei der zweiten Methode wurden zwei Fixierungs-Schritte und eine Trocknung mittels Kritischer-Punkt-Trocknung durchgeführt. Die Fixierung wurde in zwei Fixierungsschritten getrennt. Der erste Fixierungsschritt wurde direkt im Kulturmedium durchgeführt. Ohne Zentrifugation wurde 100 μL einer Glutaraldehyd-Lösung (250 mL^{-1}) zu 400 μL Algensuspension (in Kulturmedium: 500 mL^{-1} K+S-Abstoßlösung) hinzugegeben. Hierdurch wurde ein Vorfixierungsgemisch aus Glutaraldehyd (50 mL^{-1}) in 500 mL^{-1} K+S-Abstoßlösung erzeugt. Die Fixierung erfolgte 15 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde diese fixierte Lösung auf einen Objektträger aufgetropft, mit einem Deckglas abgedeckt und in flüssigem Stickstoff eingelegt. Mit Hilfe einer Rasierklinge wurde das Deckglas wiederum entfernt. In einem zweiten Fixierungsschritt wurde der Objektträger in ein Fixierungsgemisch aus 2 % LL^{-1} OsO_4 in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer (pH 7,2) für 15 Minuten inkubiert. Die Entwässerung erfolgte nacheinander für jeweils 5 Minuten in aufsteigenden Ethanolkonzentrationen (25 % (LL^{-1}), 50 % (LL^{-1}), 75 %

(LL^{-1}) und 99 % (LL^{-1}). Anschließend erfolgte die Trocknung mittels Kritische-Punkt-Trocknung. Zusammenfassend ergaben sich folgende Arbeitsschritte:

1. Erste Fixierung in Kulturmedium mit 5 % (LL^{-1}) Glutaraldehyd
2. Auftragung der Probe auf einen speziellen Objektträger
3. Zweite Fixierung in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer (pH 7,2) mit 2 % (LL^{-1}) Osmiumtetroxid
4. Trocknung mittels Kritischer-Punkt-Trocknungsanlage
5. Bespatterung Sputter (5000M, Polaron) mit Gold
6. Aufnahme im Rasterelektronenmikroskop (Quanta 400FE, FEI)

4.3.4.4 DNA-Extraktion und PCR mit Agarosegelelektrophorese

Für die Genotypisierung wurden molekularbiologische Standardverfahren angewendet. Bei der Extraktion und Aufreinigung der DNA aus der Ursprungsprobe wurde das Kit ZR Plant/Seed DNA MiniPrep verwendet (Research, 2011). Für die DNA Extraktion aus den Organismen des Probenmaterials, die sich in flüssigem Medium befanden, wurden die festen Bestandteile zuerst abzentrifugiert. Die Zentrifugation wurde für 5 Minuten in 15 mL Zentrifugenröhrchen mit einer Bench-Top Zentrifuge bei $8000 \times g$ durchgeführt. Für die Vervielfältigung der 18S rRNA kodierten Regionen der genomischen DNA wurde ein PCR-Ansatz wie folgt erstellt: 10 μL 2x Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Finnzymes, 2011), 8,5 μL H_2O , 0,5 μL Primer (2683: AACCTGGTTGATCCTGCCAGT), 0,5 μL Primer (2684: TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC) und 0,5 μL DNA-Lösung.

Es wurden PCR-Reaktionen mit Primern Eurofins (2011) durchgeführt, die unspezifisch an die 18S-Bereiche eukaryotischer DNA binden, sogenannte modifizierte Primer (Medlin et al., 1988). Im einzelnen:

2683 Primer A 5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3' (Medlin et al., 1988)

2684 Primer B 5'-TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3' (Medlin et al., 1988)

Die PCR wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, siehe Tabelle 4.9:

Mittels einer Agarosegelelektrophorese wurde die Durchführung der PCR überprüft. Die DNA-Proben wurden auf ein 1-prozentiges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (Aaij and Borst, 1972). Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer angesetzt. Als Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer. Die DNA-Proben wurden mit dem 0,1fachen Volumen

Tabelle 4.9: Standard PCR-Programm in einem Thermocycler (Tpersonal, Biometra) in 0,2 mL Reaktionsgefäßen

Arbeitsschritt	Temperatur (°C)	Zeit (S)
1 Initiale Denaturierung	98	60
2 Denaturierung	98	5
3 Primerhybridisierung	57	5
4 Primerverlängerung	72	40
Schleife mit 40 Zyklen ab Schritt 2		
5 Exponentielles Anwachsen	72	60
6 Pause	10	-

an 10x Ladepuffer versetzt und die Geltaschen beladen. An das Gel wurde eine Spannung von 80 - 120 V angelegt. Die aufgetrennten Banden konnten ausgeschnitten und die Nukleinsäure daraus eluiert werden. Für die Extraktion der DNA aus dem Gelstück wurde das Kit NucleoSpin Extract II verwendet (Macherey-Nagel, 2011).

Folgende chemische Komponenten und Konzentrationen wurden eingesetzt:

- Agarose
- Ethidiumbromidlösung (Endkonzentration im Gel: 13 ng/mL)
- 50x TAE-Puffer (48,4 g Tris-Base, 11,42 mL Eisessig, 20 ml 0,5 M EDTA)
- 1x TAE-Puffer (1 mM Guanodin (0,28 g/L))
- 5x Proben-/Laufpuffer (60 mL destilliertes Wasser, 36 ml Glycerin, Spatelspitze Bromphenolblau)
- DNA-Größenmarker: Lambda/PstI, (Fermentas, 2011)

4.3.4.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde von einer Sequenzierungsfirma (Seqlab, 2011) durchgeführt. Hierfür wurde in einem 0,2 mL Reaktionsgefäß 5 μ L der aufgereinigten Plasmid-DNA mit 2 μ L des Sequenzierungsprimers [2684] Primer B 5'-TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3' versetzt (Medlin et al., 1988)

4.3.4.6 Datenanalyse

Der Vergleich der ermittelten Sequenzdaten³ mit Datenbankeinträgen wurde mit dem Blast-Algorithmus (Altschul et al., 1990) durchgeführt. Dieser ist über die Internet-Seiten des NCBI (NCBI, 2011) abrufbar. Die Suche erfolgte mit Standardeinstellungen des BLASTn-Algorithmus in der „Nucleotide collection“ (nr/nt)-Datenbank. Mit dem Programm MEGA wurde die Daten phylogenetisch analysiert (Tamura et al., 2011). Bei dem frei verfügbaren Programm wurden die Parameter auf den Standardeinstellungen gelassen (gap opening penalty 15, gap extension penalty 6,66). Durch eine Bootstrap-Analyse wurden 1000 zufällige Datensätze erstellt, die für eine Stammbaumberechnung genutzt wurden. Die prozentualen Bootstrapwerte an den Knoten gaben an, wie oft dabei ein gegebener Ast des Stammbaums wiedergefunden wurde (Knoop and Müller, 2008).

³Die bioinformatische Analyse der Sequenzierungsdaten beinhaltet einerseits einen Vergleich der ermittelten Sequenzdaten mit Datenbankeinträgen und zum anderen eine phylogenetische Einordnung.

5 Ergebnisse

5.1 Entwicklung des Screeningsystem-Prototyps

5.1.1 Photobioreaktor-Prototyp

5.1.1.1 Systemaufbau Standardreaktor

Das entwickelte Einweg-Photobioreaktor-System besteht aus einem Gehäuse und einem Klemmprofil. Abbildung 4.1 zeigt das Komplettsystem. In Abbildung 5.2 ist ein Ausschnitt des Screening-Systems mit zehn Reaktorschläuchen ohne Gehäuse- und Klemmprofil in Seiten- und Frontansicht dargestellt.

5.1.1.2 Systemaufbau Wippreaktor

Für scherkraftanfällige Mikroalgen ist das neu entwickelte Screeningsystem abgeändert worden (siehe Abbildung 5.1). Die Durchmischung wird bei diesem System nicht durch die Begasung gewährleistet sondern durch eine von einem Exzentermotor erzeugte Wippbewegung. Eine Begasung findet hierbei nicht statt.

5.1.1.3 Systemeigenschaften Reaktormatten

Diese Reaktormatten bestehen aus Polyethylen (PE) mit einer Innenbeschichtung aus Ethylenvinylacetat (EVA). In der kommerziellen Anwendung werden diese Plastikmatten für die Verpackungsindustrie hergestellt. Dies ermöglicht auch den sehr geringen Herstellungspreis. Die Skizze 5.2 verdeutlicht die Anordnung des Messkopfes auf der beweglichen Messschiene. In der Seitenansicht ist zu erkennen, wie die Begasungsluft über die Belüftungsregler reguliert wird.

Abbildung 5.3 zeigt die Transmissionseigenschaften der verwendeten PE-EVA Matten. Im Mittel über den gesamten Messbereich (300 nm - 2500 nm) liegt die Transmission bei 87

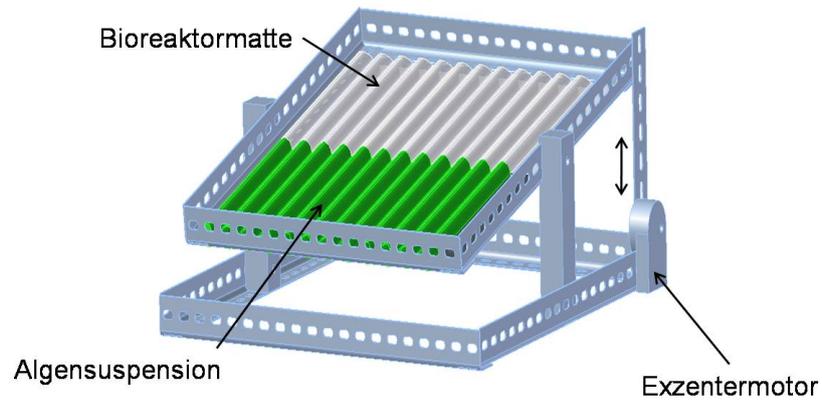


Abbildung 5.1: Skizze des eingesetzten Wippreaktors

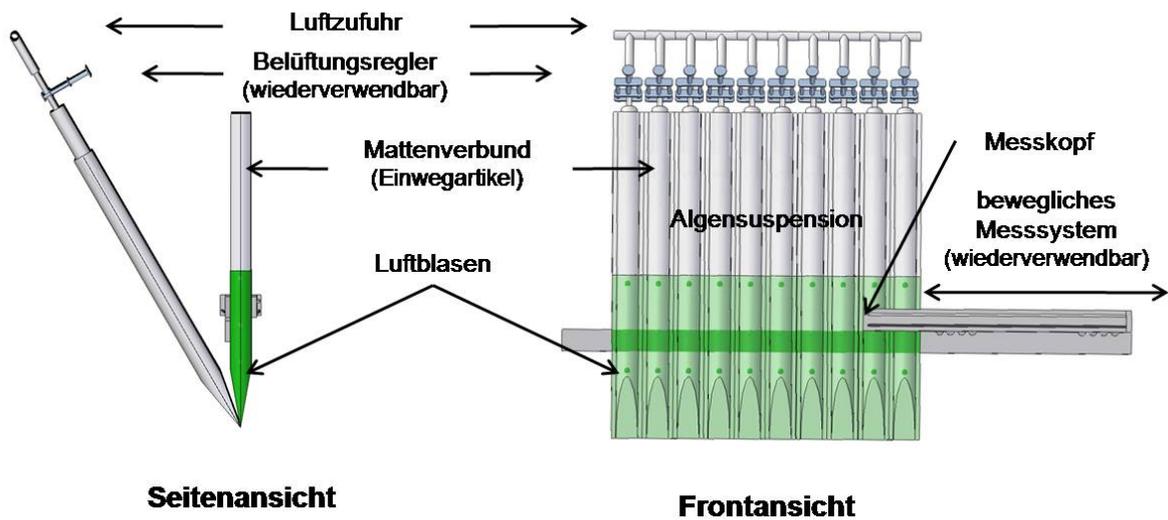


Abbildung 5.2: Seiten- und Frontskizze der eingesetzten Reaktorschläuche

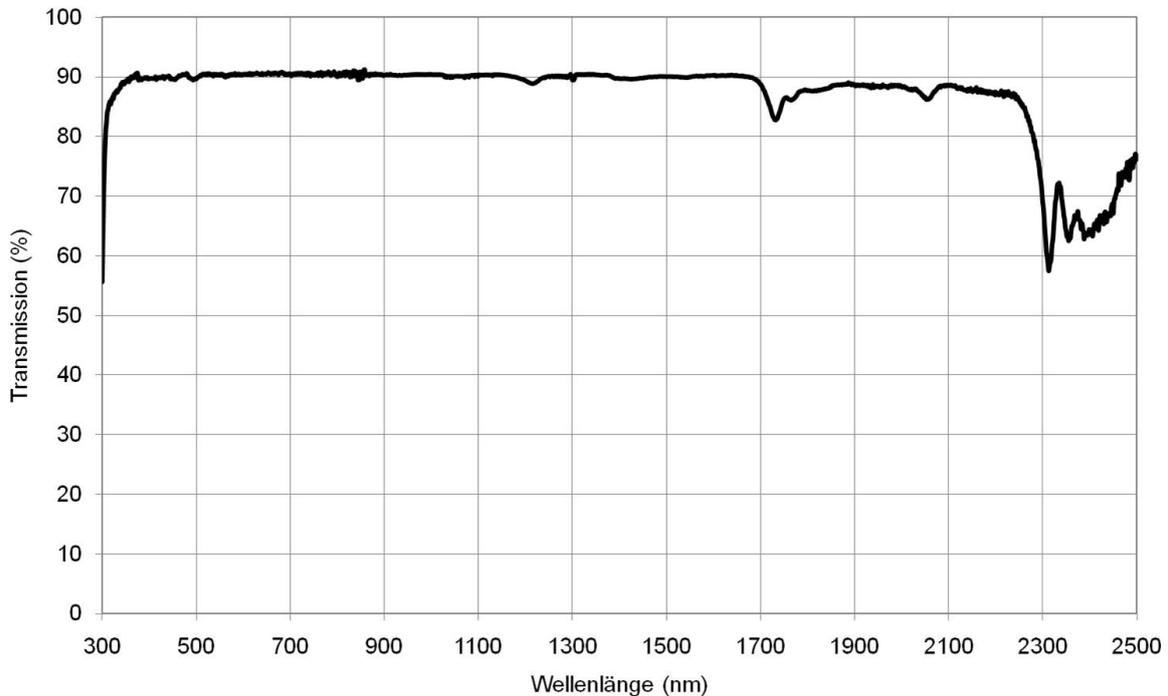


Abbildung 5.3: Transmission der PE-EVA-Matten

%. Für die einzelnen Strahlungsbereiche unterteilt, ergibt sich für die UV-Strahlung (300 nm - 420 nm) eine Transmission von 87 %, für die VIS-Strahlung (420 - 780 nm) eine Transmission von 90 % und für die NIR-Strahlung (780 nm - 2500 nm) eine Transmission von 87 %. Im photosynthetisch wichtigen Spektralbereich wird die Lichtintensität durch das Material um ungefähr 10 % geschwächt.

5.1.1.4 Begasung und Durchmischung

Die Funktionsweise des Einweg-Photobioreaktor-Systems beruht auf dem Airliftprinzip. Wie in Abbildung 5.4 dargestellt, wird die Raumluft mittels einer Pumpe (Seliger, 2011) angesaugt, anschließend sterilgefiltert und über eine Befeuchtungsflasche befeuchtet (5.4 a). Die Durchflussmenge wird reaktorröhrenspezifisch mittels Belüftungsregler gleichmäßig auf 13 L h^{-1} bei $0,014 \cdot 10^6 \text{ Pa}$ eingestellt und in die Matten einseitig eingedrückt. Die in die Reaktorröhre einströmende Raumluft verdrängt die Algensuspension bis zur Knickfalte (5.4 b-c).

In dem Moment, wenn die gesamte Algensuspension auf einer Schlauseite ist, ist der

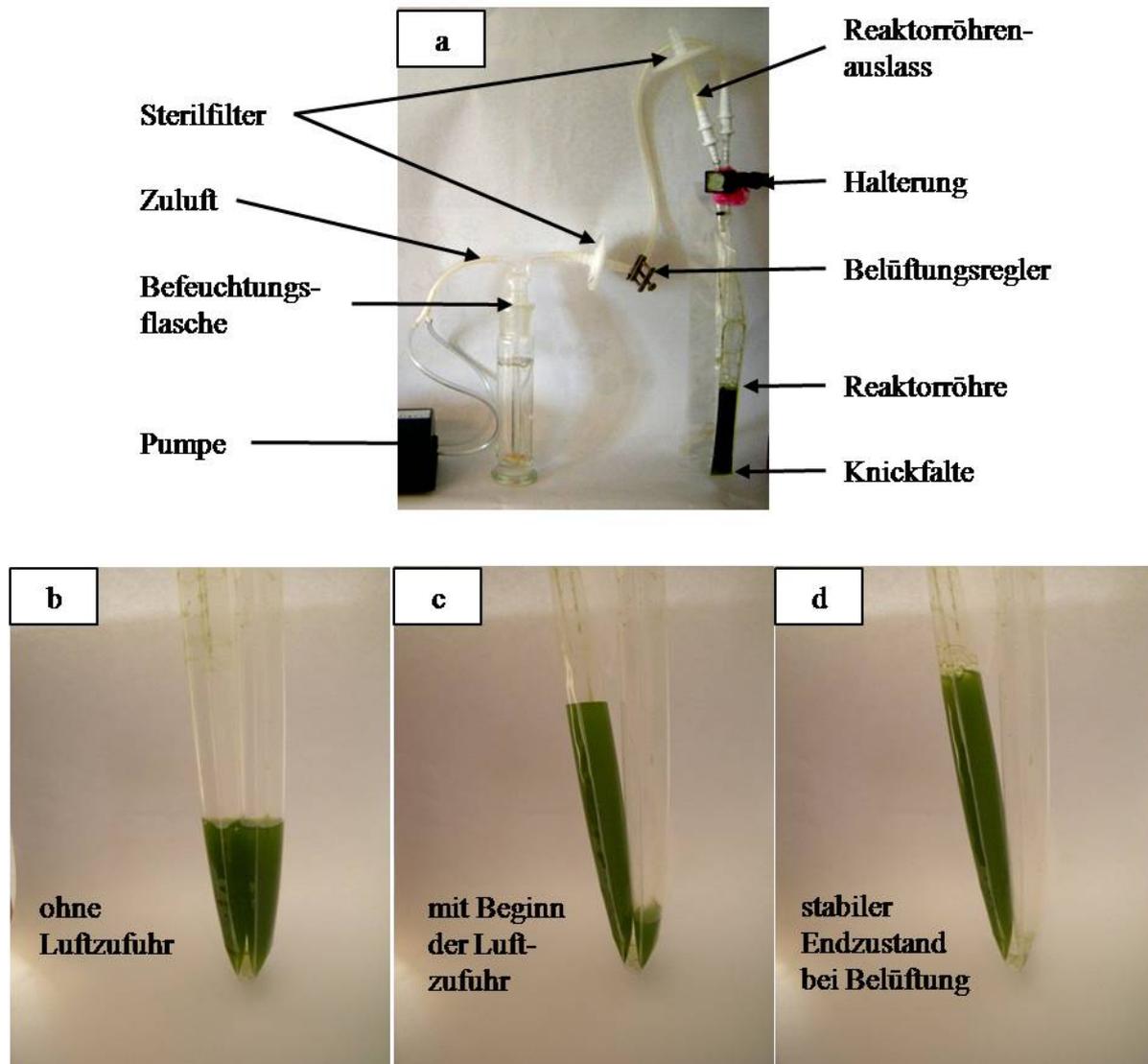


Abbildung 5.4: Begasungsprinzip der Einzelschläuche

Druck der einströmenden Raumluft maximal und gleich der Gewichtskraft der Algensuspension. Da die Pumpe weiterhin Raumluft in die Reaktormatte drückt, verändert die Pumpe ihre Kennlinie und ermöglicht, dass Luftblasen an der Knickfalte entstehen und innerhalb der Algensuspension aufsteigen, was zu einer Durchmischung der Algensuspension führt. Zudem wird eine Ablagerung von Mikroalgen am Reaktorröhrenboden verhindert (5.4 d). Der Reaktorröhrenausslass kann wiederum mit einem Sterilfilter versehen werden, so dass ein steriles Entweichen der Begasungsluft ermöglicht wird.

5.1.1.5 Systemvergleich (Wachstum)

In Abbildung 5.5 ist ein Wachstumsvergleich von *C. vulgaris* in unterschiedlichen Reaktorsystemen dargestellt. Die verwendeten Reaktoren waren eine Kulturflasche (nicht belüfteter Erlenmeyerkolben), eine Mikrotiterplatte (96 Well-Platte), ein Reaktorbeutel (geschlossener und nicht belüfteter Bioreaktorbeutel) und der neu konzipierte Screeningreaktor. Das Wachstum der Mikroalge wurde über einen Zeitraum von 28 Tagen beobachtet.

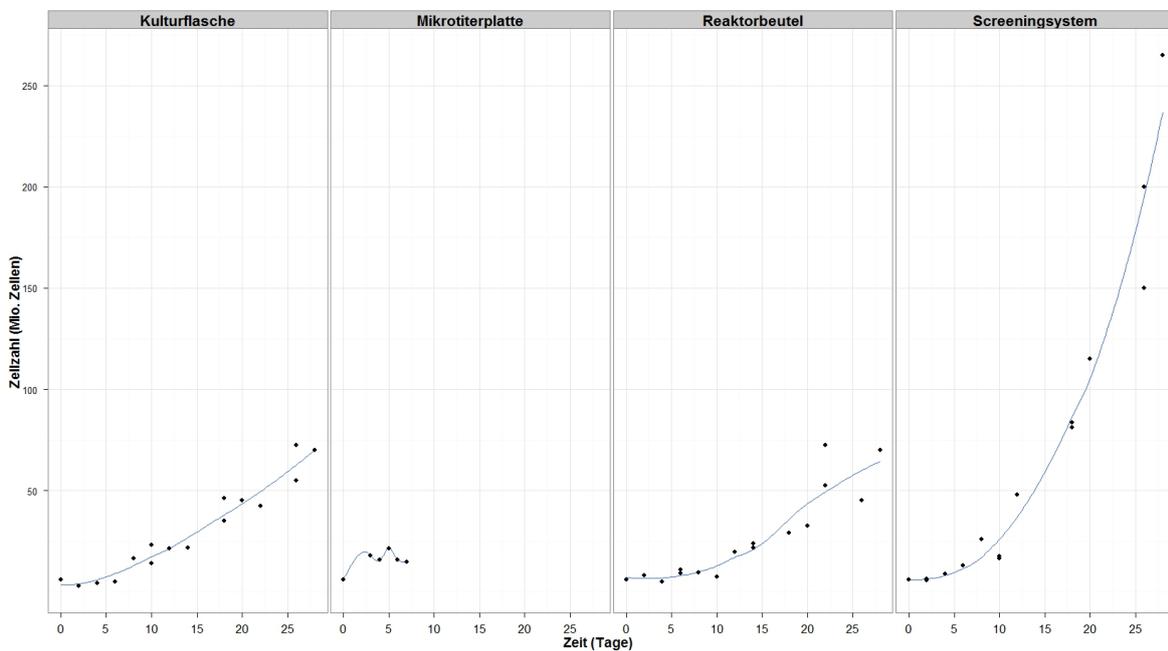


Abbildung 5.5: Algenwachstum von *Chlorella vulgaris* in unterschiedlichen Reaktorsystemen

Die Zellzahl lag am Anfang der Kultur bei allen Reaktorsystemen bei 6×10^6 Zellen mL^{-1} . Bei der Kultur in der Kulturflasche stieg die Zellzahl in 28 Tagen auf 58×10^6 Zellen mL^{-1}

mit einer Wachstumsrate von $\mu = 0,194 d^{-1}$ an. die Wachstumsrate wurde nach Formel 4.1 vom 5. bis zum 25. Tag berechnet, bis auf die Messungen in der Mikrotiterplatte. Hier endete die Kultur nach acht Tagen. Bei der Mikrotiterplatte stieg die Zellzahl in acht Tagen auf $17,3 \times 10^6$ Zellen mL^{-1} an. Bei der Kultur in der Mikrotiterplatte zeigte sich nach acht Tagen ein Absterben der Mikroalgen. Im Reaktorbeutel konnte ein Anstieg der Zellzahl auf 72×10^6 Zellen mL^{-1} , mit einer Wachstumsrate von $\mu = 0,178 d^{-1}$ verzeichnet werden. Wie in der Abbildung zu erkennen ist, liegt die Wachstumsrate bei der Kultur im Screeningsystem mit $\mu = 0,267 d^{-1}$ am höchsten. Die Zellzahl stieg hier in 28 Tagen auf 253×10^6 Zellen mL^{-1} an.

Tabelle 5.1: Wachstumsraten beim Systemvergleich der verwendeten Photobioreaktoren

Reaktor	Reaktorbeutel	Mikrotiterplatte	Kulturflasche	Screeningsystem
Wachstumsrate [d^{-1}]	0,178	-	0,194	0,267

5.1.2 Sensorik

5.1.2.1 Aufbau und Funktionsweise

Bei dem entwickeltem Sensorsystem handelt es sich um eine zangenähnliche Konstruktion (siehe Abbildung 5.6 a-b), welche eine Messung der PE-EVA Matten im Lichtweg mit definierter Länge und Positionierung der Detektoren zwischen Lichtquelle und Detektor ermöglicht. Die in Abbildung 5.6 a-c dargestellte Fahrschiene des Sensorsystems wurde aus Aluminium gefertigt. In die jeweils vorderen Enden der Aluminiumvierkantprofile wurden zwei sich gegenüber liegende Bohrungen eingefügt, so dass sich die Enden der Lichtleiter (von der Lichtquelle bzw. zum Spektrometer) stets gegenüber standen. Eine weitere Bohrung diente zur Positionierung des Lichtleiters für die Chlorophyllfluoreszenzmessung. Madenschrauben fixierten den Lichtleiter ortsfest. Die Länge der Zange betrug insgesamt 60 cm. Hierdurch konnte der Messkopf die gesamte Mattenbreite für Messungen abtasten. Die Halterung aus Aluminium am hinteren Ende der Zange garantierte, dass die Arme verlässlich zueinander ausgerichtet blieben. An dieser Stelle war die Zange mit der fahrbaren Schiene verbunden. Durch einen Lichtleiterwinkel (Modell 74-90-UV, (OceanOptics, 2011)) welcher an der Zange verbaut war, war das Vierkantprofil lediglich 4 cm breit, wodurch es problemlos in den Raum zwischen den Matten fahren konnte. Das

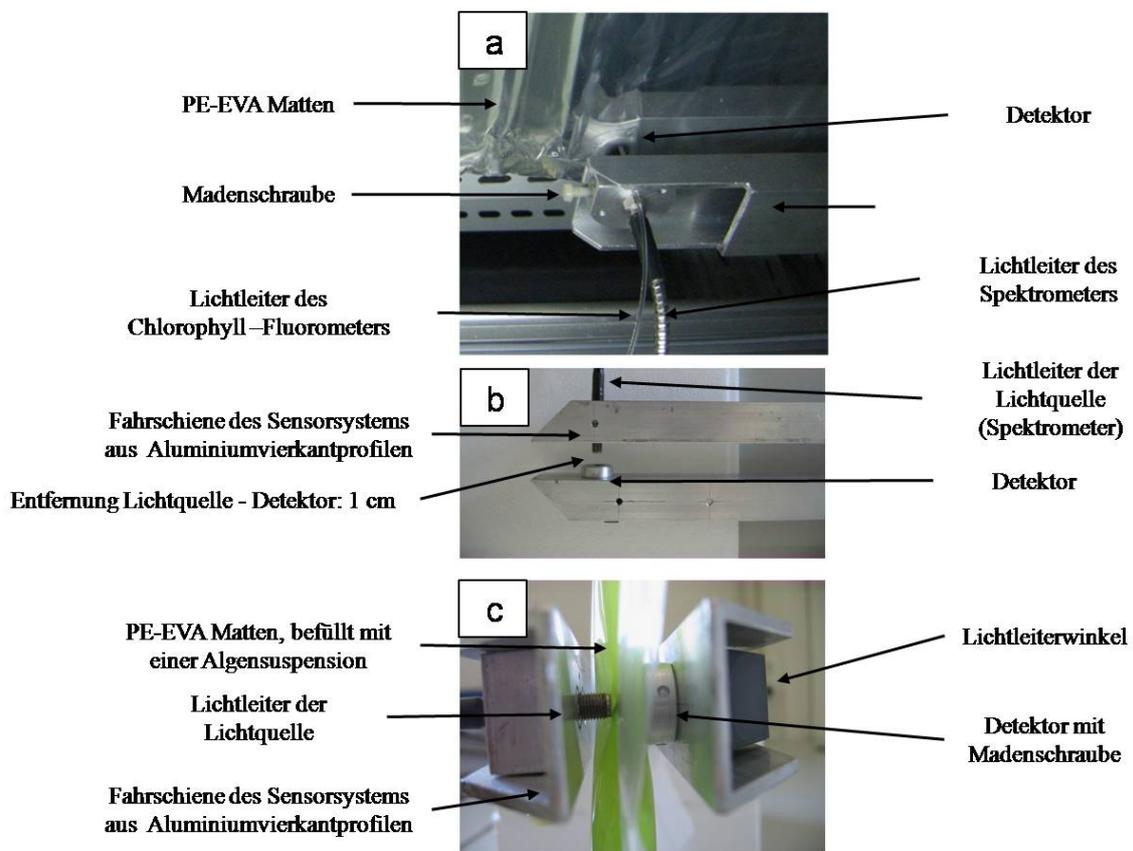


Abbildung 5.6: Sensorsystem bestehend aus einem Spektrometer (OceanOptics, 2011), einem Chlorophyll Fluorometer (Walz, 2011) und einem fahrbaren Messsystem

Messsystem wurde in ein Prototyp integriert, welcher eine autonome Positionierung des Messkopfes an die zu untersuchende Probe ermöglichte.

5.1.2.2 Extinktionsmessungen

In Abbildung 5.7 ist die Reproduzierbarkeit der mit dem System realisierten Extinktionsmessungen bei *T. thetrathele*, mit/ohne Begasung bei einer Wiederholung von $n = 13$ abgebildet. Die Messung der Extinktion mit der neu entwickelten Messschiene ist links (mit Begasung) und in der Mitte (ohne Begasung) abgebildet. Rechts ist das Spektrum der herkömmlichen Küvettenmessung (Plastik-Küvette, gemessen im Perkin Elmer 900) zu sehen. Bei allen drei Spektren handelt es sich um skalierte Rohspektren im Wellenlängenbereich von 400 nm bis 800 nm. Im Bereich ab 700 nm weisen die Extinktionsspektren der neu entwickelten Messschiene eine höhere Streuung auf als das Referenzspektrum bei der Küvettenmessung. Der Chlorophyll-Peak bei 660 nm ist bei der Zangenmessung stärker ausgeprägt. Insgesamt sind die Verläufe der Spektren als sehr ähnlich zu bewerten. Eine neue Messmethode mit einer etablierten Messmethode zu vergleichen, kann durch die Quantifizierung der Differenzen der Beobachtungen erreicht werden (Bland and Altman, 1999).

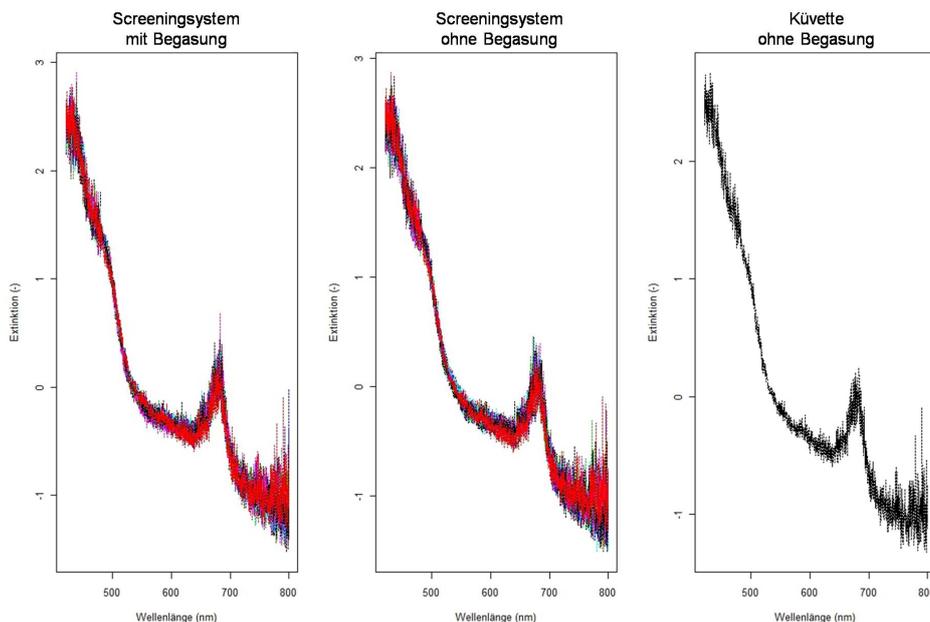


Abbildung 5.7: Extinktionsmessung bei *T. thetrathele* mit und ohne Begasung mit $n=13$ Wiederholungen

In Abbildung 5.8 sind die standardisierten Abweichungs-Residuen der Extinktionsmessungen gegenüber der Wellenlänge aufgetragen. Die Extinktionsmessungen teilen sich in die Zangenmessung mit Begasung (links) und ohne Begasung (rechts) auf.

Im optimalen Fall sollten die Residuen innerhalb des 95 %igen Konfidenzintervalls liegen.

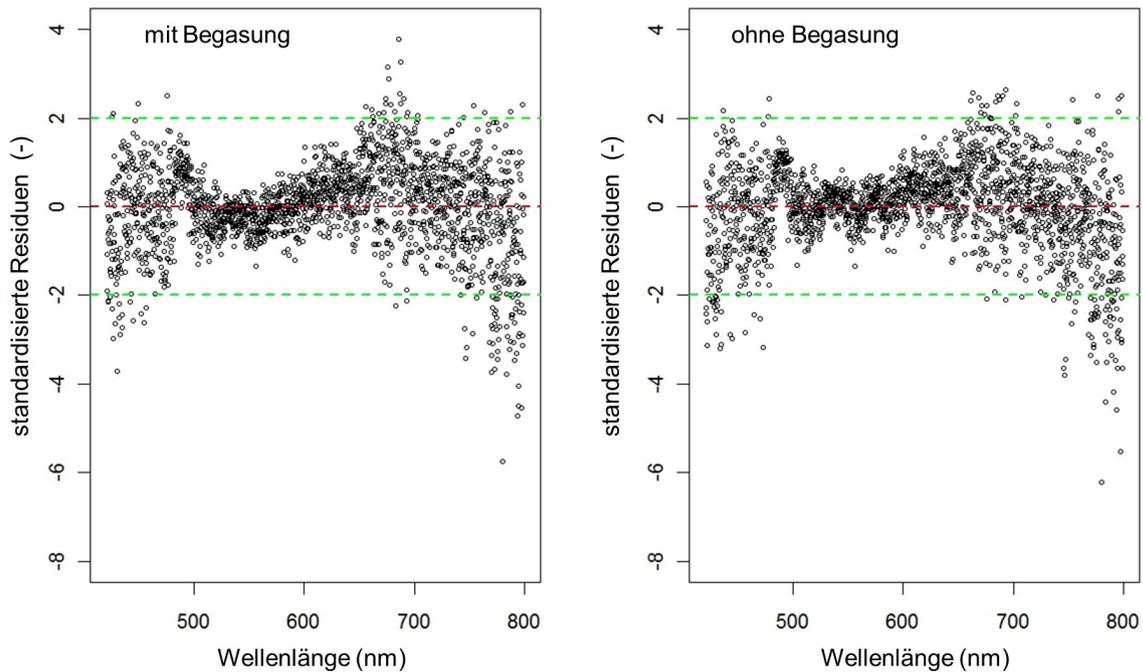


Abbildung 5.8: Standardisierte Abweichungs-Residuen in Screeningreaktoren der Extinktionsmessungen aufgetragen gegen die Wellenlänge. Punkte außerhalb des 95 % igen Konfidenzintervalls befinden sich über- und unterhalb der gestrichelten Linie. Die linke Abbildung gibt die Extinktionsmessungen mit Begasung, die rechte Abbildung die Extinktionsmessungen ohne Begasung wieder.

Die Residuen sollten gleichmäßig und ohne Struktur rund um die Nulllinie verteilt sein. In der linken Hälfte der Abbildung (mit Begasung) ist zwischen den Wellenlängen 450 nm bis 600 nm eine Struktur und keine gleichmäßige Verteilung um die Nulllinie zu erkennen. Die Struktur ist in der rechten Abbildung (ohne Begasung) nicht so stark ausgeprägt. Bei beiden Abbildungen unterliegen die niedrigen und die hohen Wellenlängenbereiche einer starken Streuung. Die Residuen sind hier zwar gleichmäßig verteilt jedoch liegen einige Residuen außerhalb des 95 % Konfidenzintervalls. Insgesamt liegen in der rechten Abbildung (ohne Begasung) weniger Residuen außerhalb des Vertrauensintervalls. Dies spiegelt auch die Aufsummierung der standardisierten Residuen wieder. Die Summe der Residuen der Messmethode mit eingeschalteter Begasung hat einen Wert von $B_{mit} = \sum_{i=1}^n \hat{e} = 1423.74$, wobei die Summe der Residuen mit ausgeschalteter Bega-

sung mit einem Wert von $B_{ohne} = \sum_{i=1}^n \hat{\epsilon}_i = 1399.35$ etwas niedriger ist. Dies bedeutet, dass hinsichtlich der Extinktionsmessung kein Unterschied zwischen mit Begasung und ohne Begasung zu erkennen ist. Die standardisierten Residuen wurden wie folgt berechnet (Precht and Kraft, 1993):

$$\hat{\epsilon}_i = \frac{Z_i - K_i}{s_i}, \quad (5.1)$$

mit

$\hat{\epsilon}_i$: standardisierte Residuen (-)

Z_i : Extinktion der Zangenmessung (-)

K_i : Extinktion der Küvettenmessung (-)

s_i : Standardabweichung je Wellenlänge bei $Z_i - K_i$ (-)

i : Wellenlänge (nm)

5.1.2.3 Chlorophyll-Fluoreszenzmessung

Die Ergebnisse der Reproduzierbarkeitsuntersuchungen zu den Chlorophyll-Fluoreszenzmessungen sind in Abbildung 5.9 dargestellt. Besonders der Unterschied einer Chlorophyll-Fluoreszenzmessung mit und ohne Begasung sollte analysiert werden.

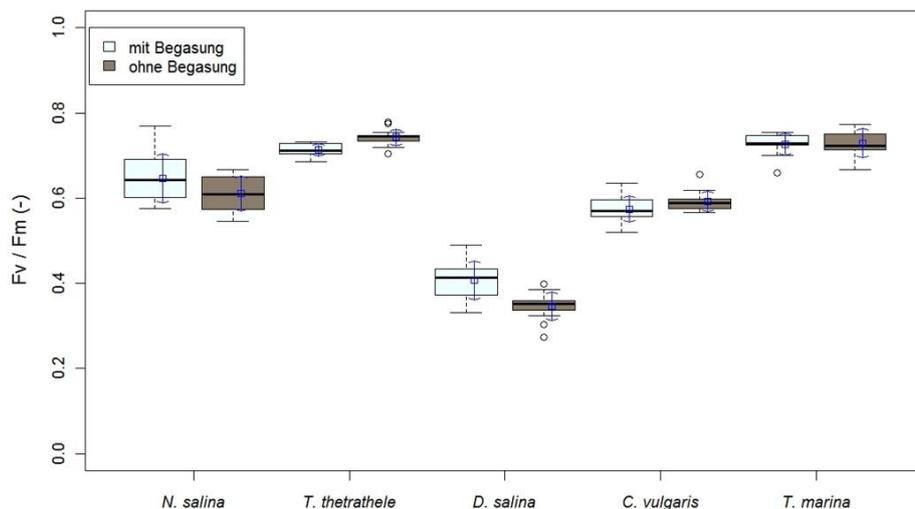


Abbildung 5.9: Chlorophyll-Fluoreszenzmessungen bei verschiedener Mikroalgen, mit und ohne Begasung im Screeningreaktor (n=15)

Es wurde der Fv/Fm - Wert der Chlorophyll-Fluoreszenz bei verschiedenen Mikroalgen wiederholend mit und ohne Begasung aufgenommen. Die Messungen bei den Mikroalgen *N. salina*, *T. tetrathele*, *C. vulgaris* und *T. marina* zeigen einen maximalen Wert für die Quantenausbeute des Photosystems II (Fv/Fm - Wert) zwischen 0,58 und 0,73. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Varianten mit und ohne Begasung. Bei *D. salina* lag der Fv/Fm-Wert der Chlorophyll-Fluoreszenz im Mittel zwischen 0,35 und 0,41. Auffallend ist, dass die Standardabweichung bei den Messungen mit Begasung mindestens genauso groß, oft aber auch größer als die Standardabweichung bei den Messungen ohne Begasung ist (siehe Abbildung 5.9).

5.2 Systemvalidierung anhand von Screeningbeispielen

5.2.1 Toleranzuntersuchungen von Mikroalgen gegenüber salinen Habitaten

5.2.1.1 Einsatz des Screeningsystems

Bei diesen Untersuchungen mit stark salinen Abwässern hielt die Bioreaktormatte den extremen Bedingungen stand. Durch die hohen Salzkonzentrationen kristallisierten die Salze am Reaktorboden aus. Aufgrund von abgestorbenen Algenzellen war bei einigen Versuchsvarianten eine Schaumbildung und eine Anheftung des abgestorbenen Algenmaterials an der Bioreaktorwand zu erkennen. Die Begasung der Bioreaktormatte funktionierte, obwohl Salzkristalle und abgestorbenes Algenmaterial sich abgesetzt hatten. Generell war ein Mikroalgenwachstum zu erkennen.

5.2.1.2 Wachstum und Überlebensraten der Salzschock- und Aufsalzungsexperimente

Die Ergebnisse der Salzschock- und Aufsalzungsexperimente sind in Abbildung 5.10 zusammengefasst. Bei dieser Darstellung ist die Überlebensrate¹ gegenüber dem Abwassergehalt für jede Mikroalge aufgetragen. Unterschieden werden weiterhin die Ergebnisse der Salzschock- und Aufsalzungsexperimente. *T. tetrathele* hat bei diesem Experiment

¹Die Überlebensrate ergibt sich aus dem Quotienten der Anzahl an Versuchswiederholungen mit Wachstum zu der Anzahl an durchgeführten Versuchswiederholungen in Prozent.

den höchsten Toleranzlevel (75 % Abwassergehalt) und die beste Wachstumsrate bei den Salzschockexperimenten. *C. vulgaris*, *T. weissflogii*, *A. platensis* und *S. bacillaris* sind gar nicht in dem Abwasser gewachsen. Daher wurden diese Algenarten in den weiteren Experimenten nicht mehr berücksichtigt. Bei den Aufsalzungsexperimenten erwies sich *D. salina* als die salztoleranteste Alge.

Für die verschiedenen Temperatur- und Lichtvarianten wurden unterschiedliche Wachstumsraten in der exponentiellen Phase festgestellt und mit Hilfe eines linearen Modells vereinfacht. Für die Alge *T. tetrahele* mit der höchsten Wachstumsrate bei höchstem Abwassergehalt sind die Interaktionen der Temperatur- und Lichtvarianten in Abbildung 5.11 dargestellt. Für die Variante mit 20 (mLL^{-1}) Düngermedium zeigten sich höhere Wachstumsraten als bei steigender Temperatur (30 °C) und geringeren Lichtintensitäten (PPFD: $15 \mu mol m^{-2} s^{-1}$). Unter diesen Bedingungen wuchs die Alge sehr gut bis zu einer Abwasserkonzentration von 75 %. In destilliertem Wasser tendierten die Algen zu einer höheren Wachstumsrate als bei höheren Lichtintensitäten. Durch dieses Screeningexperiment konnte die maximal tolerierbare Abwasserkonzentration von 75 % (LL^{-1}) festgestellt werden.

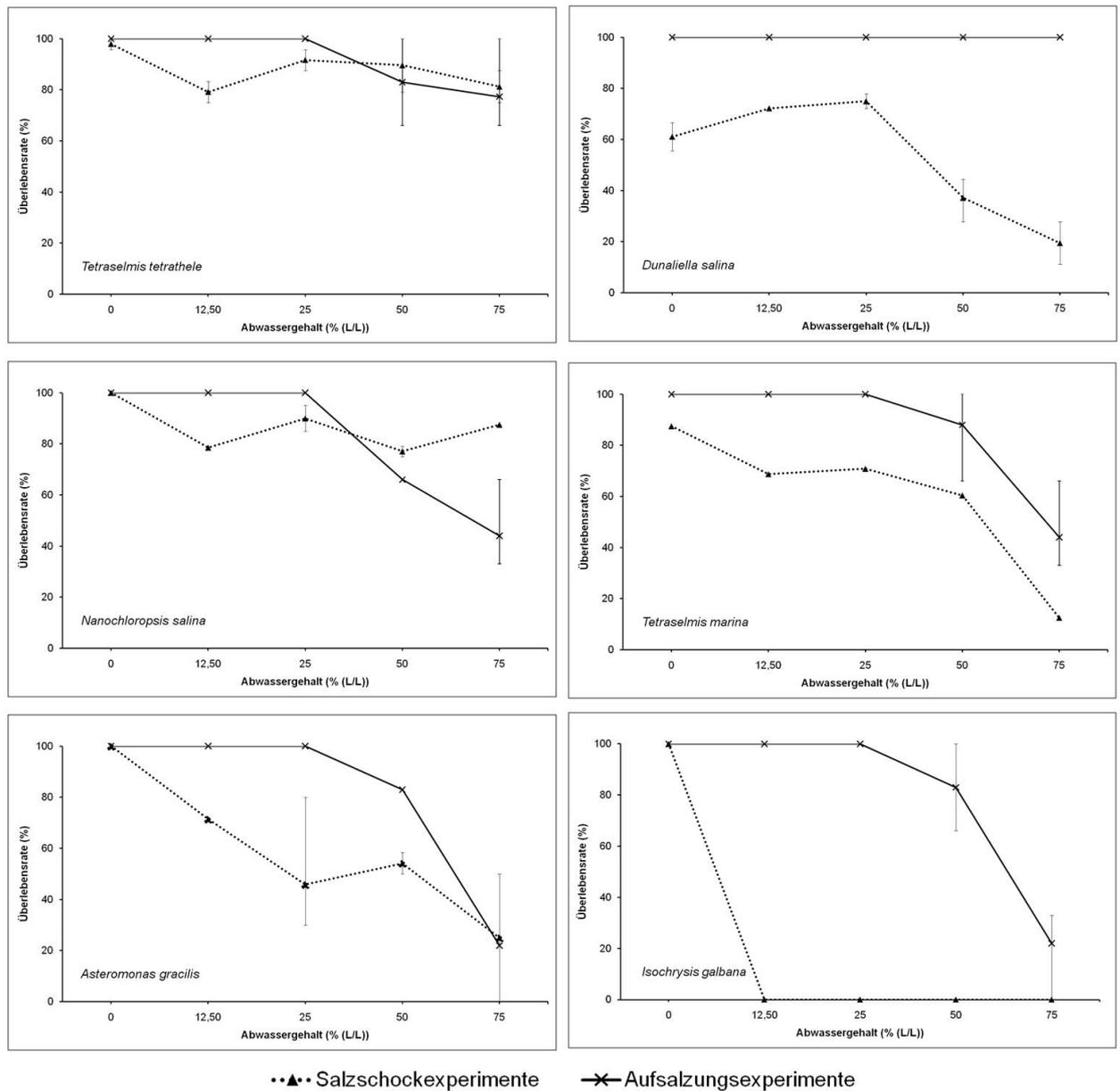
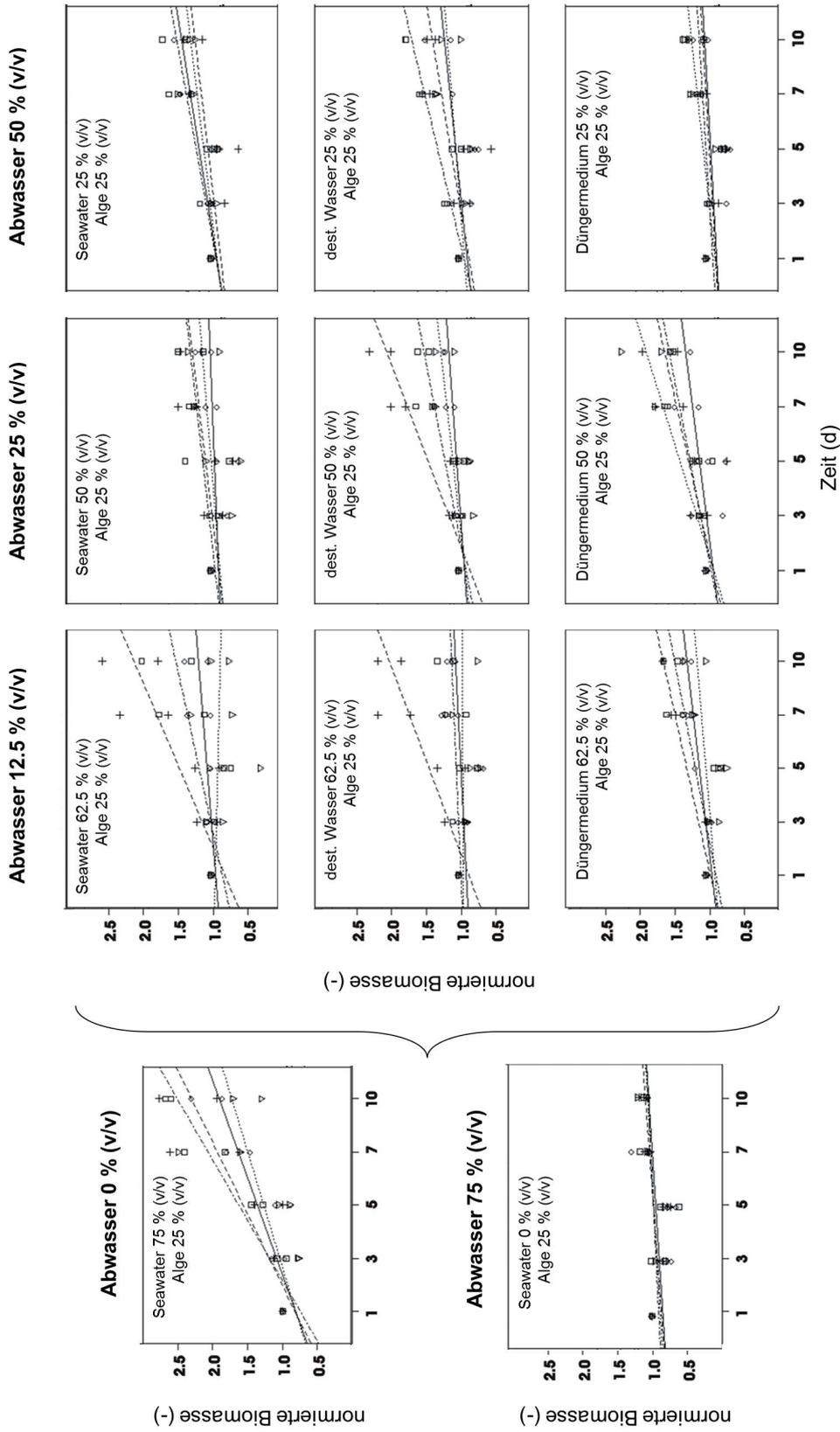


Abbildung 5.10: Überlebensrate verschiedener Algenarten in Abhängigkeit von der Abwasserkonzentration (n=5)



23° C and 15 μmol / (m³s) ◊ — 30° C and 15 μmol / (m³s) ▽
 23° C and 37 μmol / (m³s) + - - - 30° C and 37 μmol / (m³s) □ - - - -

Abbildung 5.11: Biomasse in Abhängigkeit von den Wachstumsfaktoren von *T. thetrathele*

5.2.1.3 Wachstum und Überlebensrate in Aufsalzungsexperimenten

In den Aufsalzungsexperimenten wurden Startpopulationen mit Zelldichten von 0.568×10^6 Zellen mL^{-1} hergestellt. *D. salina* zeigte dabei die beste Wachstumsrate von allen 10 verwendeten Algenarten (siehe auch Abbildung 5.10). Eine Aufsalzung des Mediums von *D. salina* führte zu einer signifikanten Erhöhung der Überlebensrate bei einem Abwassergehalt von 75 % (LL^{-1}). Bei anderen Algenarten wie zum Beispiel *N. salina* konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Die Entwicklung des Biomassezuwachses ist für *D. salina* in Abbildung 5.12 dargestellt. In der 90 % Variante enthielt das Kulturmedium nach 18 Tagen Aufsalzung 90 % Abwasser.

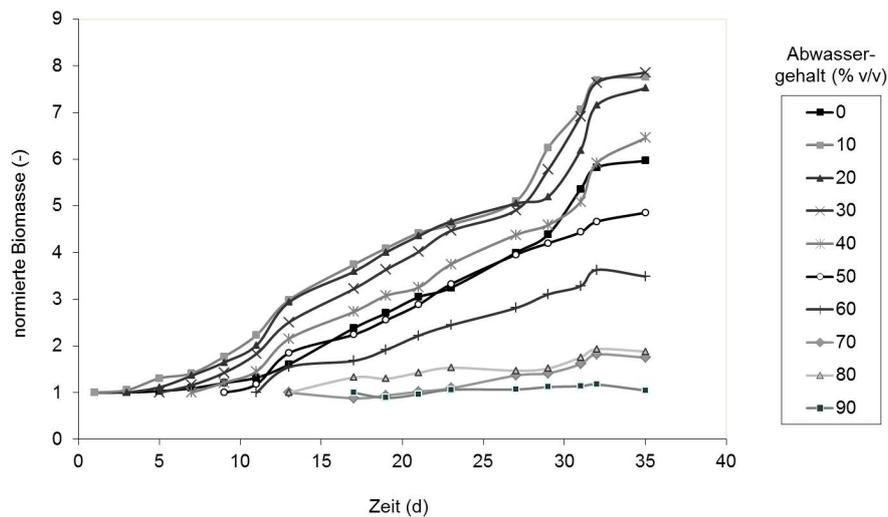


Abbildung 5.12: Biomasse von *D. salina* bei stetiger Aufsalzung des Mediums

D. salina in modified Johnson-Medium verdoppelte ihre Biomasse innerhalb von 10 Tagen. Im Vergleich dazu wurde die Wachstumsrate durch den Zusatz von geringen Konzentrationen Abwasser leicht erhöht. Bei hohen Abwasserkonzentrationen konnte der zunächst beobachtete Effekt nicht bestätigt werden. Bei Abwasserkonzentrationen über 60 % verringerte sich die Wachstumsrate im Vergleich zur Kontrolle. Erhöht sich die Abwasserkonzentration auf über 90 %, wurde keine signifikante Wachstumsrate festgestellt. Durch die stufenweise Anhebung der Abwasserkonzentration konnte offensichtlich die Abwassertoleranz von *D. salina* erhöht werden.

Die Ergebnisse der Messung des intrazellulären Ionengehaltes von *D. salina* sind in Abbildung 5.13 dargestellt. Es wird deutlich, dass gerade der Kalium- und Magnesiumgehalt der Algen mit zunehmender Abwasserkonzentration steigt. Der Kaliumgehalt von *D. salina*, gewachsen in 50 % Abwasserkonzentration, ist dreimal höher als der des Standardmediums ohne Abwasserzusatz. Bei sehr hohem Gesamtsalzgehalt im Medium wurde ein 200-facher Magnesiumgehalt gemessen. Für Natrium wurde ein generell hoher intrazellulärer Gehalt festgestellt. Dieser lag im Mittel bei $55 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ Trockenmasse. Eine Korrelation mit steigendem Salzgehalt ist bei Natrium daher nicht zu beobachten.

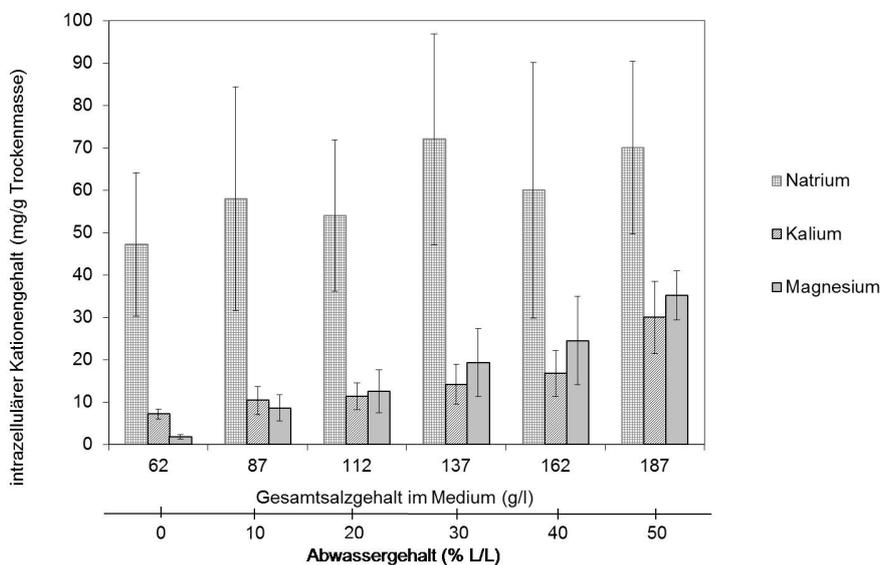


Abbildung 5.13: Intrazellulärer Ionengehalt von *D. salina* (n=3)

5.2.2 Stoffstromanalysen (Nitrat und Phosphat) in Abwasser-Algensuspensionen

5.2.2.1 Einsatz des Screeningsystems in den Untersuchungen

Nach der Auswertung der Ergebnisse konnte festgestellt werden, dass ein Wachstum der Mikroalgen im neuen Screeningsystem möglich war. Das Screeningsystem war trotz des Abwassereinsatzes funktionstüchtig, wobei Begasungs- Licht- und Temperaturregelung ohne Probleme funktionierte. Der Einsatz und die Validierung der Sensorik (Extinktions- und Chlorophyllfluoreszenzmessungen) konnten störungsfrei durchgeführt werden.

5.2.2.2 Wachstum und Vitalität

Bei den Experimenten wurde die Mikroalge *N. salina* in dem Screening-Reaktor bezüglich ihrer Fähigkeit, Nährstoffe (Phosphat und Nitrat) aus Haushaltsabwässern zu reduzieren, untersucht.

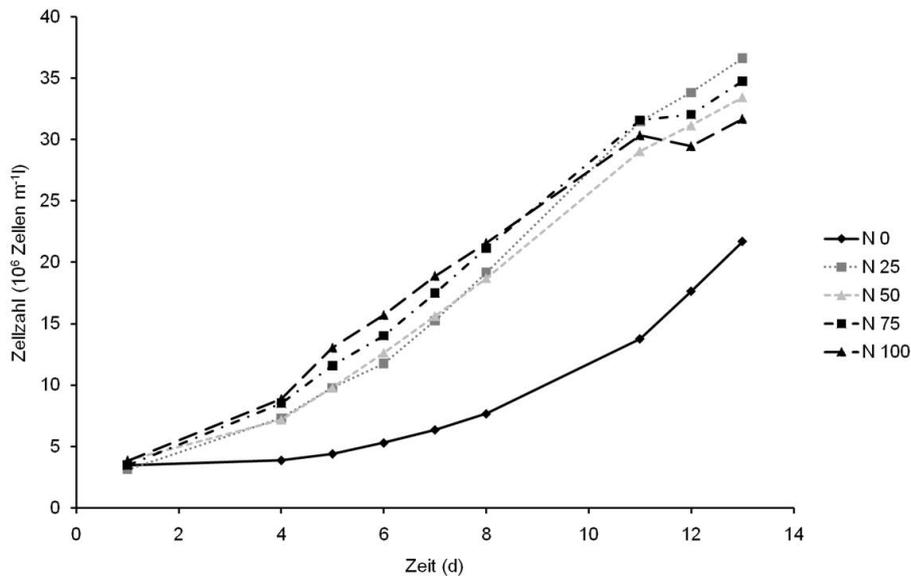


Abbildung 5.14: Wachstumsverlauf von *N. salina* bei 5 verschiedenen Abwasserkonzentrationen. Die Abkürzungen N 0, N 25, N 50, N 75 und N 100 spiegeln die Versuchsvarianten 0 %; 25 %; 50 %; 75 %; 100 % Abwasserzusatz wieder.

Abbildung 5.14 gibt die Zellzahl über die Zeit für fünf verschiedene Abwasserkonzentrationsstufen (N 0 als Kontrolle ohne Abwasserzusatz) wieder. Es ist zu erkennen, dass die Wachstumsrate, berechnet nach Gleichung 4.1 (4. bis 13. Tag), bei den Varianten mit Haushaltsabwasser (N 25 - N 100) höher sind als bei der Kontrolle (N 0). Über einen Zeitraum von 13 Tagen steigt die Zellzahl bei Variante N 25 von $3,8 \times 10^6$ Zellen mL^{-1} auf $36,6 \times 10^6$ Zellen mL^{-1} an. Bei dieser Variante ist auch die höchste Wachstumsrate mit $\mu = 0,375 d^{-1}$ zu verzeichnen. Bei der Kontrolle stieg die Zellzahl zunächst sehr langsam an. Nach 13 Tagen war die Wachstumsrate mit $\mu = 0,320 d^{-1}$ aber fast auf dem Niveau der anderen Varianten. Insgesamt stieg die Zellzahl auf nur $21,7 \times 10^6$ Zellen mL^{-1} an. Die Varianten N 50 und N 75 zeigten mit einer gleichen Wachstumsrate von $\mu = 0,363 d^{-1}$ ein ähnliches Wachstum, wobei die Variante N 50 auf eine Zelldichte von $33,5 \times 10^6$ Zellen mL^{-1} und N 75 auf eine Zelldichte von $34,8 \times 10^6$ Zellen mL^{-1} anstieg. Die Variante N 100, bei der die Mikroalgen in reinem Abwasser kultiviert wurden,

lag mit einer Wachstumsrate von $\mu = 0,348 d^{-1}$ zwischen der Kontrolle und den anderen Versuchsvarianten. Insgesamt stieg hier die Zellzahl auf $31,7 \times 10^6$ Zellen mL^{-1} an.

Chlorophyll-Fluoreszenzmessung Die Ergebnisse der Chlorophyll-Fluoreszenzmessung sind in Abbildung 5.15 dargestellt. In den Tagen 1-3 war keine messbare Chlorophyll-Fluoreszenz vorhanden. Außer bei der Variante N 75 lagen die Fv/Fm Werte am vierten Tag dicht zusammen. Es war bei allen Versuchsvarianten ein Anstieg vom vierten auf den fünften Tag zu erkennen. Am fünften Tag erreichten alle Chlorophyll-Fluoreszenzwerte ihren maximalen Wert und fielen bis zum achten Tag wieder gemeinsam ab, wo sie auf einem Niveau stagnierten.

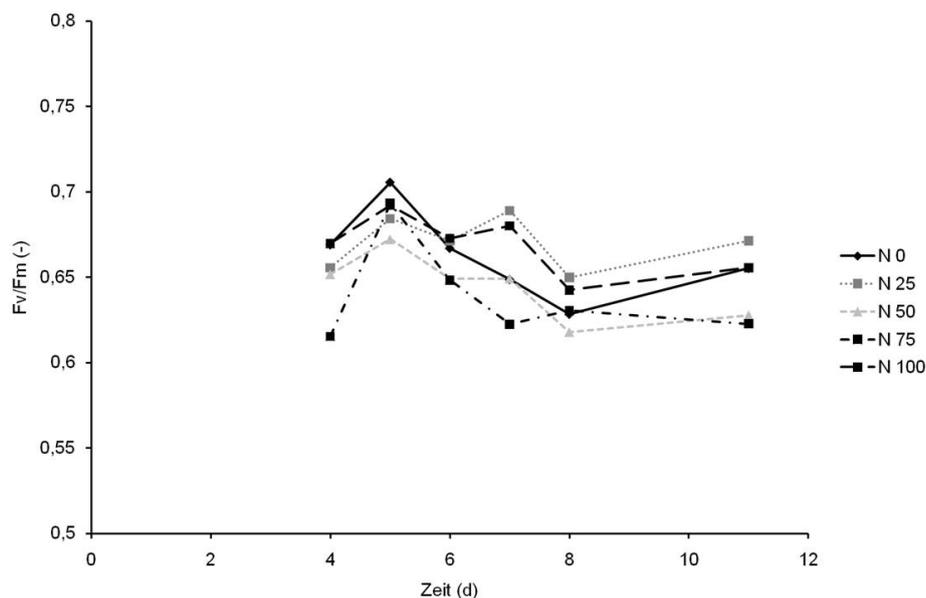


Abbildung 5.15: Potentielle Quantenausbeute des PSII, dargestellt als Fv/Fm Wert über die Kulturzeit. Die Abkürzungen N 0, N 25, N 50, N 75 und N 100 spiegeln die Versuchsvarianten 0 %; 25 %; 50 %; 75 %; 100 % Abwasserzusatz wieder.

5.2.2.3 Stoffströme von Nitrat und Phosphat

Die folgenden Abbildungen geben die Nitratkonzentration (KNO_3 in mg/L) bzw. die Phosphatkonzentration (NA_2HPO_4 in mM) im Medium über den Versuchszeitraum von 11 Tagen wieder. Die Abkürzungen N 0, N 25, N 50, N 75 und N 100 spiegeln die Versuchsvarianten 0 %; 25 %; 50 %; 75 %; 100 % Abwasserzusatz wieder. Es ist zu erkennen, dass die Varianz bei den Nitratmessungen höher ist als bei den Phosphatmessungen. Zudem ist bei allen Varianten, außer bei der Variante Nitratmessung N 100, insgesamt über

11 Tage eine Reduktion der Nitrat- und Phosphatkonzentration zu erkennen. Besonders in den Tagen 4 bis 6 kommt es bei allen Varianten zu einer starken Abnahme.

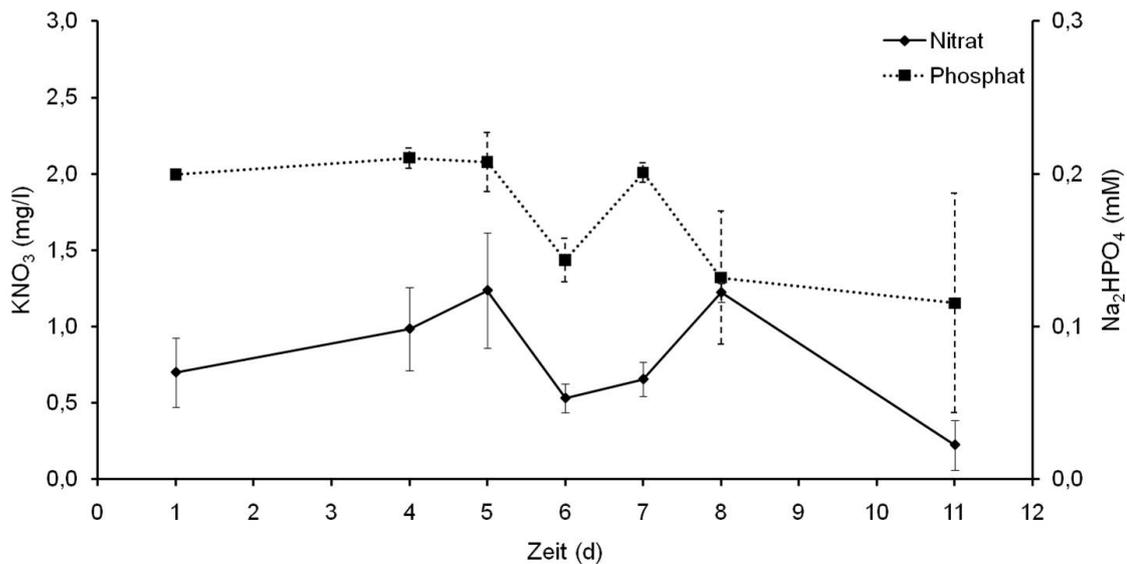


Abbildung 5.16: Nitratkonzentration (KNO_3 in mg/L) (A) und Phosphatkonzentration (Na_2HPO_4 in mM) (B) im Kulturmedium über den Versuchszeitraum von 11 Tagen ($n=4$). Abwasserkonzentration: 0 % Abwasserzusatz

Im Detail lag bei der Versuchsvariante 0 % Abwasserzusatz (siehe Abbildung 5.16) der Nitratgehalt der Kulturlösung anfangs bei $0,7 \pm 0,225 \text{ mg L}^{-1} KNO_3$ und verringerte sich im Mittel um 67,9 %. Der Phosphatgehalt reduzierte sich bei dieser Variante um 42,5 %.

Bei der Versuchsvariante 25 % Abwasserzusatz (siehe Abbildung 5.17) lag die Abnahme der Nitratkonzentration im Mittel bei 40,4 %. Auffällig war hier die sehr hohe Varianz der Nitratmessung am fünften Tag. Der Phosphatgehalt sank bei dieser Variante von $0,201 \pm 0,005 \text{ mM } Na_2HPO_4$ um 64 %.

Mit einer prozentualen Abnahme der Nitratkonzentration von 60,1 % lag die Versuchsvariante 50 % Abwasserzusatz (siehe Abbildung 5.18) im unteren Drittel aller Varianten. Es verringerte sich bei dieser Variante die Phosphatkonzentration von $0,206 \pm 0,01 \text{ mM } Na_2HPO_4$ um 88,3 %.

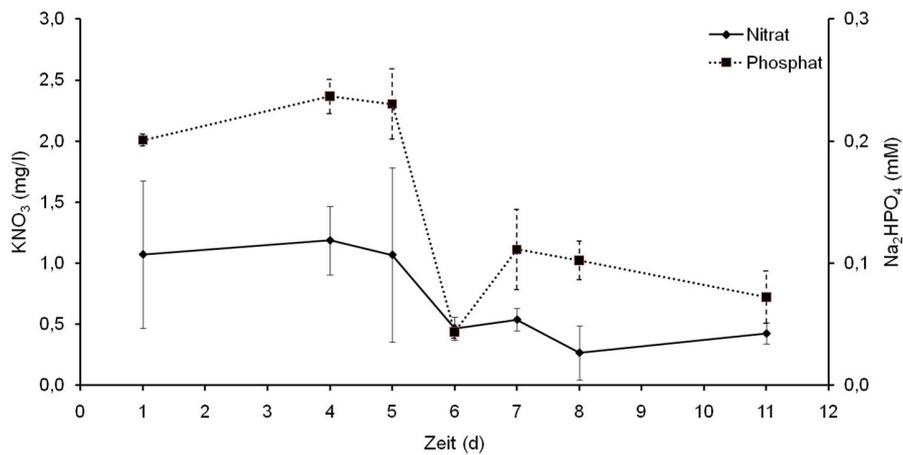


Abbildung 5.17: Nitratkonzentration (KNO_3 in mg/L) (A) und Phosphatkonzentration (Na_2HPO_4 in mM) (B) im Kulturmedium über den Versuchszeitraum von 11 Tagen ($n=4$). Abwasserkonzentration: 25 % Abwasserzusatz

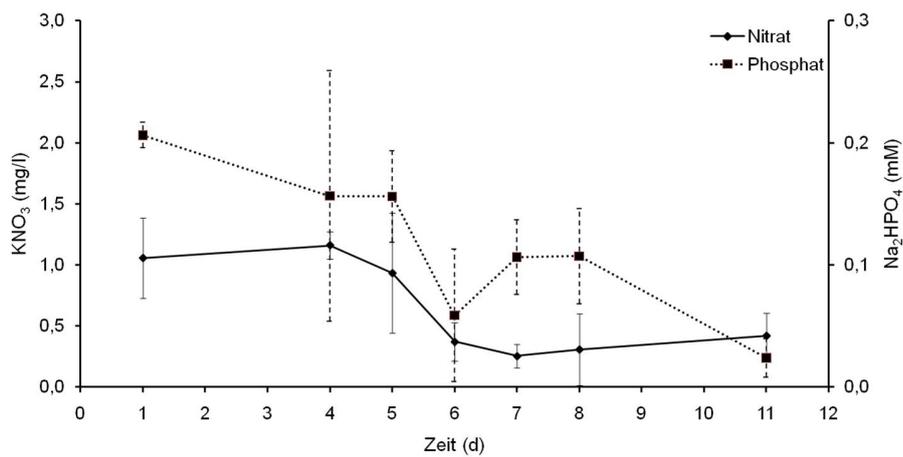


Abbildung 5.18: Nitratkonzentration (KNO_3 in mg/L) (A) und Phosphatkonzentration (Na_2HPO_4 in mM) (B) im Kulturmedium über den Versuchszeitraum von 11 Tagen ($n=4$). Abwasserkonzentration: 50 % Abwasserzusatz

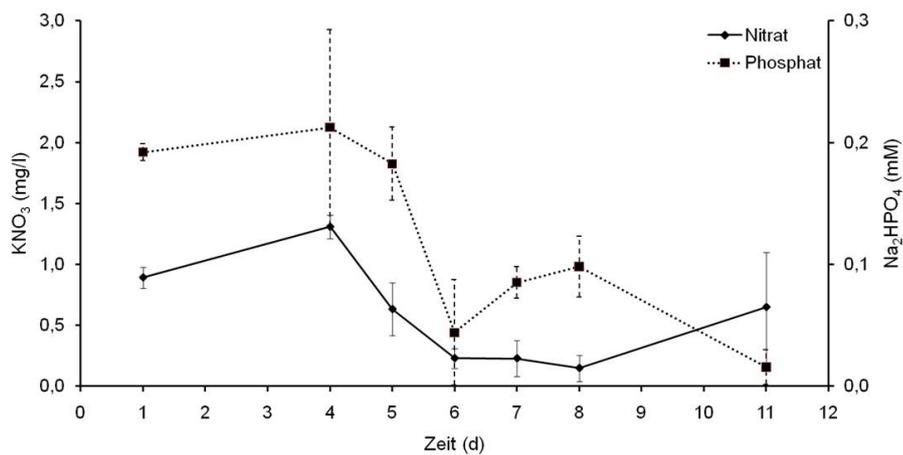


Abbildung 5.19: Nitratkonzentration (KNO_3 in mg/L) (A) und Phosphatkonzentration (Na_2HPO_4 in mM) (B) im Kulturmedium über den Versuchszeitraum von 11 Tagen ($n=4$). Abwasserkonzentration: 75 % Abwasserzusatz

Die Versuchsvariante 75 % Abwasserzusatz (siehe Abbildung 5.19) zeigte eine Abnahme der Nitratkonzentration um 27,3 % und eine Abnahme der Phosphatkonzentration um 91,7 %.

Nur die Nitratkonzentration in der Versuchsvariante 100 % Abwasserzusatz (siehe Abbildung 5.20) hatte einen Anstieg um 16,8 % zu verzeichnen. Im Gegensatz hierzu fiel die Phosphatkonzentration bei der gleichen Variante um 57,8 % ab.

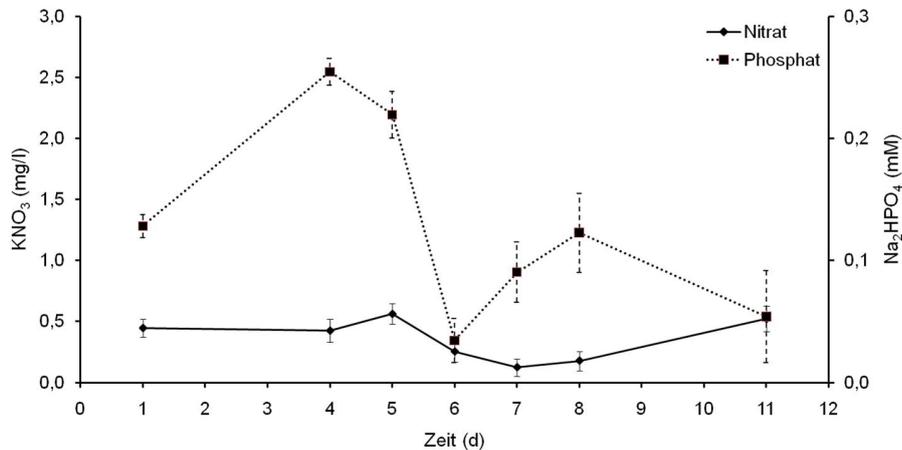


Abbildung 5.20: Nitratkonzentration (KNO_3 in mg/L) (A) und Phosphatkonzentration (Na_2HPO_4 in mM) (B) im Kulturmedium über den Versuchszeitraum von 11 Tagen ($n=4$). Abwasserkonzentration: 100 % Abwasserzusatz

5.2.2.4 Extinktionsmessung zur Bestimmung der Stoffströme von Nitrat und Phosphat

Für die Bestimmung der Nitrat- und Phosphatgehalte über Extinktionsspektren wurde die am Screening-Reaktor integrierte Sensorschiene benutzt. Die Korrelation der an der Sensorschiene ermittelten Spektraldaten mit den Nährstoffgehalten der Algensuspension, welche durch insitu-Messungen ermittelt wurden (siehe Kapitel 5.2.2.3), wird im folgenden Abschnitt erläutert. Im wesentlichen geht es darum, ob aus den ermittelten Extinktionsdaten ein Vorhersagemodell erstellt werden kann, welches die Stoffströme (hier Nitrat und Phosphat) adequat vorhersagen kann. Hierzu werden die entwickelten Extinktionsmodelle anhand der gemessenen Phosphat- und Nitratgehalte überprüft.

Abbildung 5.21 links zeigt einen Abfall des Vorhersagefehlers der Kreuzvalidierung bei steigender Anzahl an Modellkomponenten (Wellenlängenkombination). Der geringste Vorhersagefehler wird bei zwei Modellkomponenten erreicht. Das optimale Modell für die Phosphatgehaltvorhersage beinhaltet somit zwei Modellkomponenten. Angewendet auf den Prüfdatensatz ergibt sich die Vorhersagequalität, welche in Abbildung 5.21 rechts dargestellt ist. Aufgetragen sind die gemessenen Phosphatgehalte gegen die vorhergesag-

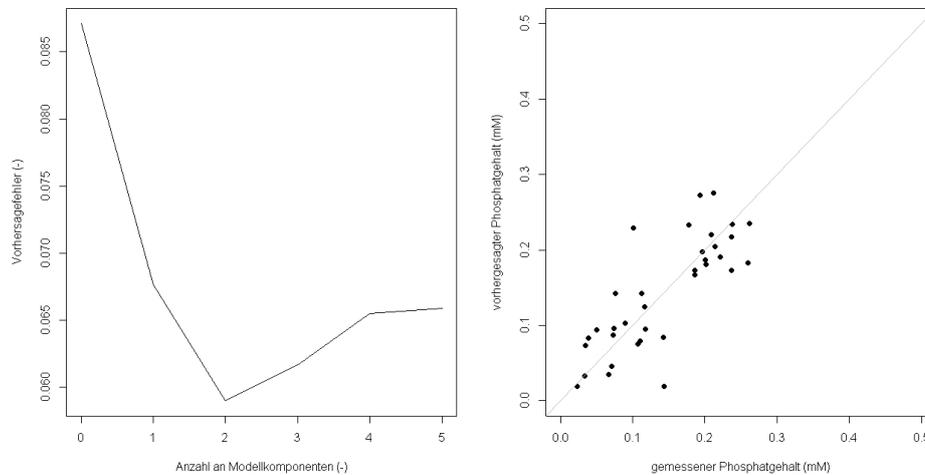


Abbildung 5.21: Vorhersagefehler der Kreuzvalidierung aufgetragen gegen die Anzahl an Komponenten des PLS-Modells (links) und Vorhersagequalität des optimalen Modells für Phosphat mit zwei PLS-Modellkomponenten (rechts)

ten Phosphatgehalte. Im optimalen Fall würden die Punkte auf der Winkelhalbierenden (graue Linie) liegen. In diesem Fall liegen die Punkte gleichmäßig verteilt um diese Linie. Ein PLS-Modell mit zwei Komponenten kann 52 % der Varianz erklären.

In Tabelle 5.2 ist die Vorhersagegüte für die spektrale Bestimmung der Phosphat- und Nitratgehalte dargestellt. Mit Hilfe von zwei Modellkomponenten im Modell für die Vorhersage des Phosphatgehaltes liegt der Vorhersagefehler bei 0,043 mM bei einem Mittelwert der Vorhersagen von 0,138 mM mit einem Bestimmtheitsmaß von 64 %. Bei der Vorhersage des Nitratgehaltes kann durch das Modell (eine Modellkomponente) 13 % der Varianz erklärt werden. Hier liegt der Vorhersagefehler bei 0,433 mg^{-L} bei einer mittleren Vorhersage von 0,635 mg^{-L}.

Tabelle 5.2: Ergebnisse der Vorhersagegüte für den Phosphat- und Nitratgehalt

	Vorhersagefehler (mM bzw. mg ^{-L})	R ² (%)	Anzahl an Modellkomponenten (-)	Mittelwert der Vorhersagen (mM bzw. mg ^{-L})
Phosphat	0,043	64,65	2	0,138
Nitrat	0,433	13,20	1	0,635

5.2.3 Phäno- und Genotypisierung unbekannter Algenspezies

5.2.3.1 Einsatz des Screeningsystems bei Mikroalgen mit Flagellen

Das Screeningsystem bildete die Grundlage für die Phänotypisierung der unbekanntes Algenspezies. Es stellte sich heraus, dass die unbekanntes Mikroalgenspezies sich mittels Flagellen fortbewegt. Dies bedeutet, dass trotz der erhöhten Scherkräfte durch die Begasung im neu entwickelten Screeningsystem ein Wachstum von Mikroalgen mit Flagellen möglich ist. Es war zu erkennen, dass in der Algensuspension sehr wenig Mikroalgen vorhanden waren. Aus diesem Grund starben vermehrt Mikroalgen ab und setzten sich an der Reaktorwand ab.

5.2.3.2 Wachstum

Mit Hilfe des Screening-Reaktors konnten die Ergebnisse der Wachstumsversuche, welche in Tabelle 5.3 dargestellt sind, ermittelt werden. Es wird deutlich, dass die spezifische Wachstumsrate ihr Maximum bei der Versuchsvariante 50 % Abwasserzusatz-Konzentration, einer Temperatur von 30 °C und einer Belichtung von 40 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ hatte. Das Minimum der Wachstumsrate lag bei einer Abwasserzusatz-Konzentration von 75 %, einer Temperatur von 20 °C und einer Belichtung von 20 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Tabelle 5.3: Spezifische Wachstumsrate der Phäno- und Genotypisierungsversuche gemessen per Extinktionsmessungen in der exponentiellen Wachstumsphase (1. Tag bis 9. Tag)

spez. Wachstumsrate d^{-1}	Konzentration ($L L^{-1}$)	Temperatur °C	Belichtung $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$
0.1800	0,75	20	20
0.1897	0,50	20	20
0.1800	0,75	30	20
0.1886	0,50	30	20
0.1238	0,75	20	40
0.1901	0,50	20	40
0.2593	0,75	30	40
0.4067	0,50	30	40

5.2.3.3 Phänotypisierung

Die Ergebnisse der Phänotypisierung sind in Abbildung 5.22 dargestellt. Die licht- und elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen eine Mikroalge mit zwei Flagellen. Die Mikroalge ist $8,5 \mu m$ lang und hat eine Breite von $3,6 \mu m$. Die zwei Flagellen haben eine Länge von $12 \mu m$ und eine glatte Oberfläche. Auf dem elektronenmikroskopischen Bild ist neben der Mikroalge auch ein Salzkristall und andere Verunreinigungen zu erkennen.

5.2.3.4 Genotypisierung

Die Ergebnisse der Genotypisierung wurden durch PCR-Ansätze mit verschiedenen Primerpaaren nach einer Aufreinigung der Gesamt-DNA erstellt. In Abbildung 5.23 sind die Amplifikate der PCR elektrophoretisch aufgetrennt auf einem Agarosegel zu erkennen. Auf der Laufbahn M ist der DNA-Größenmarker $\lambda/PstI$ aufgetragen. Laufbahn 1 und 2 zeigt die DNA, welche mit dem Primerpaar 2683/2684 amplifiziert wurde. Da die DNA-Fragmente beider Ansätze bei etwa 1800 bp liegen, kann davon ausgegangen werden, dass die PCR ohne Störungen gelaufen ist. In Laufbahn 1 ist eine kleine Bande unterhalb der großen Bande zu erkennen. In Laufbahn 2 ist diese kleinere Bande nicht zu finden. Die DNA wurde aus dem Agarosegel der beiden Laufbahnen ausgeschnitten, eluiert und der Sequenzierungsfirma übergeben.

Die BLASTn-Ergebnisse der Sequenzierungsdaten sind in Tabelle 5.4 und 5.5 dargestellt. In der ersten Spalte ist die Zugangsnummer der Sequenz abgebildet. Mit dieser Nummer kann die Sequenz in einer Datenbank identifiziert werden. In der zweiten Spalte wird die Sequenz kurz beschrieben. Oftmals wird auch der Organismus genannt, zudem die Sequenz gehört. Die dritte Spalte „Max-Wert“ gibt die maximale Punktzahl der Übereinstimmung wieder. Die Höhe des Max-Wertes spiegelt die Länge und Qualität der Übereinstimmung wieder. Die Spalte der Deckungsgleichheit gibt die prozentuale Übereinstimmung der neuen Sequenz gegenüber der Sequenz aus der Datenbank wieder.

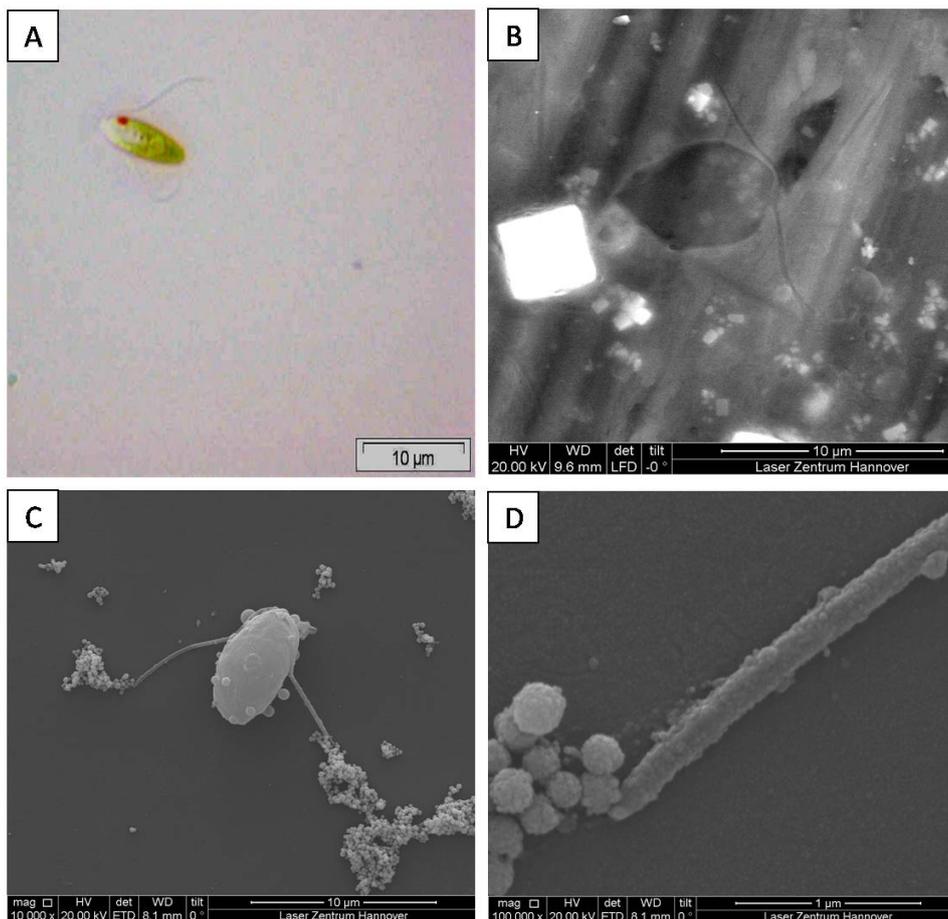


Abbildung 5.22: Aufnahmen im Rahmen der Phänotypisierung einer unbekanntes Algenspezies. (A) Mikroalge im Lichtmikroskop, 1000-fache Vergrößerung; (B) Mikroalge im Rasterelektronenmikroskop, 10000-fache Vergrößerung, ohne Vorbehandlung der Probe; (C) Mikroalge im Rasterelektronenmikroskop, 10000-fache Vergrößerung, Vorbehandlung: 2 stufiges Fixierungsverfahren und kritische-Punkt-Trocknung; (D) Mikroalge im Rasterelektronenmikroskop, 100000-fache Vergrößerung, Vorbehandlung: 2 stufiges Fixierungsverfahren und Kritische-Punkt-Trocknung

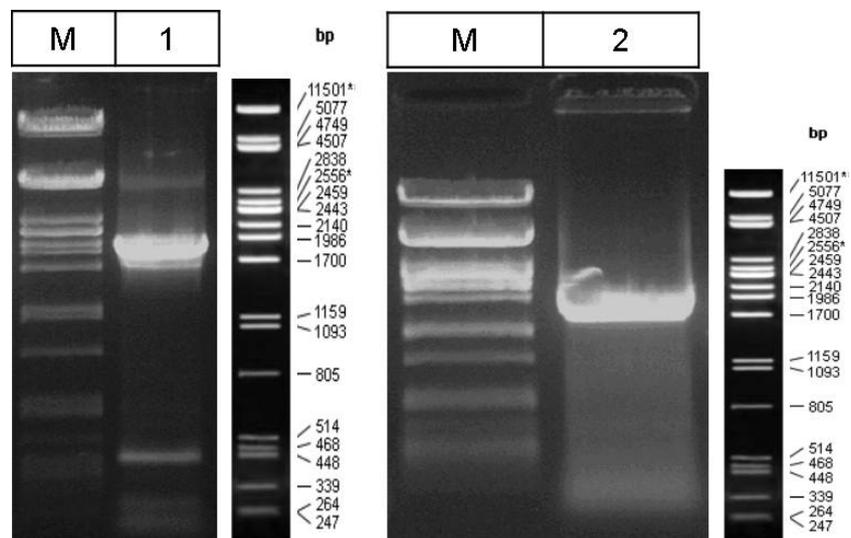


Abbildung 5.23: Agarosegelelektrophorese von zwei PCR-Amplifikaten mit der Primerkombinationen 2683/2684. Laufbahn M enthält den DNA-Größenmarker Lamda/PstI. Laufbahn 1-2 enthalten die amplifizierte DNA von zwei Wiederholungen

Tabelle 5.4: BLASTn Ergebniss der Sequenzierung der 1. Laufbahn.

Zugang	Beschreibung	Max-Wert (-)	Deckungsgleichheit (%)	Max-Identität (%)
GU170210.1	Stramenopile sp. ME280100	1173	97	97
GU170209.1	Stramenopile sp. ME13100	950	83	96
DQ269470.1	Halocafeteria seosinensis	885	82	94
DQ269469.1	Halocafeteria sp. EHF0502	865	82	93
AY789780.1	Uncultured eukaryote isolate P6X4-1	819	81	92
AY520445.1	Bicosoeca vacillans strain ATCC 50063	730	81	89
AY642710.1	Uncultured eukaryotic picoplankton clone P34.6	730	81	89
AY919785.1	Uncultured freshwater eukaryote clone LG30-01	721	81	89
AF243501.1	Adriamonas peritocrescens	721	81	89
FJ410649.1	Uncultured bicosoecid clone EBF12.136	713	80	89

Die neue Sequenz der 1. Laufbahn deckt sich zu 97 % mit der Sequenz in der Datenbank. Der BLASTn Algorithmus gibt zusätzlich einen E-Wert heraus. Dieser Wert gibt die Wahrscheinlichkeit der zufälligen Trefferquote wieder. In Beispiel aus Tabelle 5.4 lag der Wert bei allen Ergebnissen bei 0. Dies bedeutet, dass ein Zufallstreffer sehr unwahrscheinlich ist. Die maximale Übereinstimmung wird in der Spalte „Max-Identität“ abgebildet. Dieser Wert zeigt die während des Berechnungsverfahrens höchste prozentuale Übereinstimmung an. In diesem Beispiel deckten sich die beiden prozentualen Übereinstimmungsmerkmale mit einem Wert von 97 %. Dies besagt, dass 97 % der neuen Sequenz mit einer Sequenz in der Datenbank übereinstimmen. Die Sequenz in der Datenbank ist unter der Nummer GU170210.1 hinterlegt und wird der Stramenopile Spezies zugeordnet (siehe Tabelle 5.4) (Park and Simpson, 2010).

Die ermittelte Sequenz der 2. Laufbahn hat 93 % der Länge einer Sequenz in der Datenbank. Die höchste prozentuale Übereinstimmung liegt bei 98 %. Die ermittelte Sequenz in der Datenbank wird der Spezies Dunaliella zugeordnet und ist unter der Nummer M62998.1 hinterlegt (siehe Tabelle 5.5).

Die Ergebnisse der Genotypisierung zeigten, dass im vorliegenden Fall eine Mischprobe aus Stramenopile und Dunaliella vorlag.

Tabelle 5.5: BLASTn Ergebniss der Sequenzierung der 2. Laufbahn.

Zugang	Beschreibung	Max-Wert (-)	Deckungsgleichheit (%)	Max-Identität (%)
M62998.1	Dunaliella parva	907	93	98
EF195157.1	Dunaliella salina	902	93	98
EF473749.1	Dunaliella salina CCAP 19/30	896	93	98
EF473747.1	Dunaliella tertiolecta CCAP/19/27	896	93	98
EF473745.1	Dunaliella salina CCAP 19/18	896	93	98
EF473743.1	Dunaliella salina CCAP 19/3	896	93	98
EF473740.1	Dunaliella salina SAG 42.88	896	93	98
EF473739.1	Dunaliella salina SAG 19-3	896	93	98
EF473737.1	Dunaliella tertiolecta SAG 13.86	896	93	98
EF473731.1	Dunaliella salina Dsge	896	93	98

6 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Validierung eines Einweg-Photobioreaktor-System für das Massenscreening von Mikroalgen. Es sollte ein Photobioreaktor-System aus Einwegmaterialien entwickelt werden, welches für die Kultur von Mikroalgen geeignet ist. Um das Ergebnis der Entwicklung des Einweg-Photobioreaktor-Systems sowie den Einfluss der Wachstumsbedingungen zu beurteilen, wurden mit dem System drei Validierungsversuche durchgeführt.

In dem ersten Abschnitt dieses Kapitels wird das Einweg-Photobioreaktor-System diskutiert. Anschließend werden die Ergebnisse der Validierungsversuche mit anderen Veröffentlichungen verglichen und der Einfluss des Einweg-Photobioreaktor-Systems diskutiert.

6.1 Entwicklung des Screeningsystem-Prototyps

6.1.1 Photobioreaktor-Prototyp

6.1.1.1 Systemeigenschaften

Auf dem Markt sind Screening-Systeme für Mikroalgen nicht erhältlich. Einige Autoren schlagen Mikrotiterplatten als eine alternative Screening-Plattform vor (Eriksen, 2008). Mikrotiterplatten sind für die Kultur nur bedingt geeignet. Mangelhafter Gasaustausch sowie kurze Wachstumsdauer und eine unbefriedigende Analysemöglichkeit lassen ein Screening von Mikroalgen nicht zu. Um vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, ist es wichtig, dass die Parameter eines Screenings (beispielsweise Kulturführungsparameter) gleich sind. Das vorgestellte System ist besser für Screening-Anwendungen geeignet als Erlenmeyerkolben oder Plastik-Flatpanel-Reaktoren, welche von Eriksen (2008) beschrieben werden, da es aus Einwegmaterialien bestehen und die Vergleichbarkeit jeder einzelnen Kulturröhre gegeben ist. Mit einer Erhöhung der Parallelexperimente verringern sich die Analysemöglichkeiten eines Einzelexperimentes, wenn beispielsweise bei einem

Einzelexperiment ein Rührreaktor und bei vielen Parallelexperimenten eine Mikrotiterplatte verwendet wird. Bei einem Rührreaktor ist die Kulturführung aufwendig und die Online-Analytik stark ausgeprägt. Dies hat zur Folge, dass bei begrenzten Möglichkeiten (finanziell oder bautechnisch) eine geringe Anzahl an Parallelexperimenten möglich ist. Bei vielen Parallelexperimenten, beispielsweise in Mikrotiterplatten, kann nur eine einfache Online-Analytik aufgrund des geringen Reaktorvolumens durchgeführt werden.

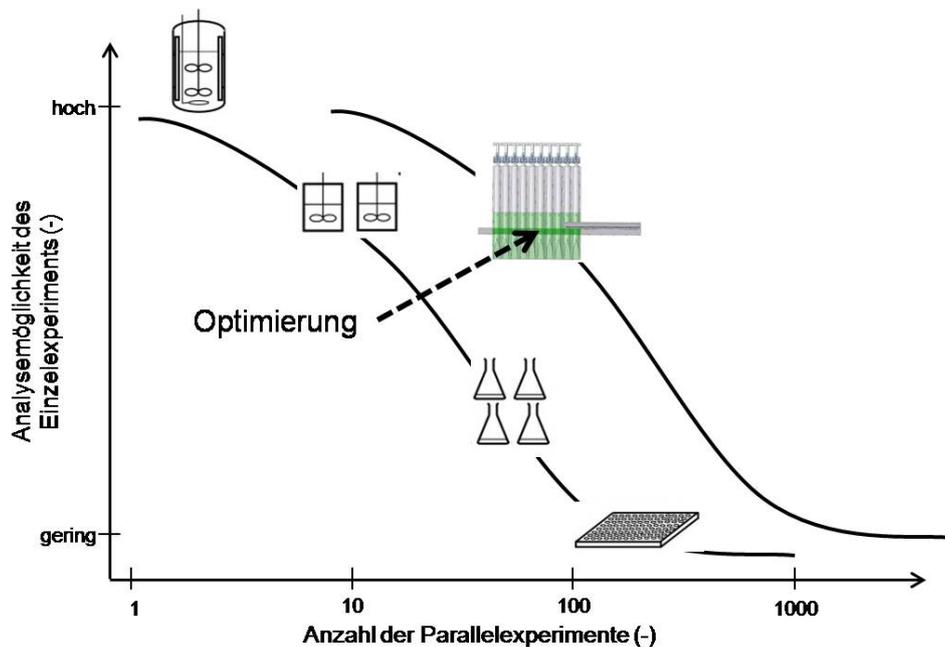


Abbildung 6.1: Vergleich der Analysemöglichkeiten eines Einzelexperimentes bzw. der Anzahl an Parallelexperimenten von kommerziell erhältlichen und dem neu entwickelten Einweg-Photobioreaktor-System, verändert nach Betts (2006); Voelkening et al. (2004).

In Abbildung 6.1 ist das neu entwickelte Einweg-Photobioreaktor-System als Vergleich zu den kommerziell erhältlichen Systemen dargestellt. Mit Hilfe des neu entwickelten Systems kann eine Optimierung des Screenings ermöglicht werden. Durch die Optimierung steigt die Anzahl an Parallelexperimenten als auch die Analysemöglichkeit der Einzelexperimente. In der Literatur werden anstatt der Analysemöglichkeit des Einzelexperiments die erhältlichen Prozessinformationen bewertet und mit der Anzahl an Parallelexperimenten korreliert. Aufgrund des neu entwickelten Screening-Systems wurde die Bewertung von Screening-Systemen in Abbildung erweitert (Betts, 2006; Voelkening et al., 2004).

6.1.1.2 Wachstum

Wie sich zeigte, war das neu entwickelte Screeningsystem als Anzuchtsystem den geschüttelten Referenzkulturen (Kulturflasche, Mikrotiterplatte und Reaktorbeutel) deutlich überlegen. Für *C. vulgaris* schlug sich dies in vielfach höheren Zellzahlen am Ende der Kulturdauer nieder. Der Grund hierfür lag wahrscheinlich an der Durchmischung der Kulturen durch das am Screeningsystem installierte Airlift-System. Dies wirkte sich in zweierlei Weise auf das Wachstum der Kulturen aus. Einerseits kam es, gerade bei höheren Zelldichten, zu einer erhöhten Lichtexposition der einzelnen Algenzellen. Durch die Durchmischung der Algensuspension mittels aufsteigender Luftblasen der Begasung wurden die Algenzellen immer wieder von dem mit wenig Licht durchfluteten Raum im inneren des Reaktors an den äußeren, stark belichteten Rand des Reaktors transportiert. Wachstumshemmungen infolge verminderten Lichteintrags in die Kulturen wurden hierdurch minimiert. Dies konnte auch durch die Arbeit von Grobbelaar et al. (1996) bestätigt werden. Hier wurde veröffentlicht, dass sich höhere Frequenzen von hell/dunkel-Zyklen positiv auf das Zellwachstum auswirken. Da das im Screeningsystem verwendete Airliftprinzip diese höheren Frequenzen verursacht, könnte dies eine Begründung für die vielfach höheren Zelldichten sein. Auch die geringe Schichtdicke des Screeningsystems fördert einen hohen Lichteintrag in den inneren Raum des Reaktorsystems und die dadurch resultierenden hohen Zelldichten. Neben dem Lichttransfer ist die Versorgung mit CO₂, sowie die Entfernung des produzierten Sauerstoffs aus der Algensuspension die wichtigste Aufgabe eines Photobioreaktors (Posten, 2009). Die im Screeningsystem verwendete Begasungseinheit führte zu einem verbesserten Gasaustausch zwischen Algen, Kulturmedium und Umwelt im Vergleich zu den Schüttelkulturen, wodurch sich eine weitere Wachstumssteigerung ergeben haben dürfte. Das im neu entwickelten Screening-System gemessene, vermehrte Wachstum bis zum 11. Versuchstag ist durch Begasungseffekte zu erklären. *C. vulgaris* zeigte in den Schüttelkulturen, bis auf die Versuche in Mikrotiterplatten, ein kontinuierliches Wachstum über die Versuchsdauer.

In der vorliegenden Arbeit ist in der Mikrotiterplatte ein geringes Wachstum zu beobachten. Dies deckt sich mit Beobachtungen aus anderen Studien (Tillich et al., 2012). Hier wurde ebenfalls eine Abnahme des Wachstums in den ersten fünf Versuchstagen bei der Kultivierung des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC 6803 beobachtet. Jedoch erfolgte in der erwähnten Studie anschließend ein starkes Wachstum.

Generell ist zu konstatieren, dass die neuen Reaktorbeutel, wenn diese auf einem Wipp-

reaktor verwendet wurden, starke Tendenzen zu Verklumpung und Anheftung der Algen an die Mattenoberfläche zeigten, vermutlich als Konsequenz der geringen Schüttelraten. Die im Reaktorbeutel aufgetretenen Kontaminationen waren wahrscheinlich durch mangelnde Hygiene bei der Probenentnahme zu begründen und sind kein systemspezifisches Problem.

Die im neu entwickelten Screening-System auftretenden Streuungen der Zellzahlen sind durch leicht unterschiedliche Begasungsraten innerhalb der verschiedenen Mattenkompartimente zu begründen. Der Einfluss verschiedener Begasungsstärken wurde bereits von anderen Autoren beschrieben (Changhai et al., 2005). Die Autoren berücksichtigten bei ihren Untersuchungen zwar nicht das neu entwickelte Screening-System, trotzdem kann aus der Literatur abgeleitet werden, dass ein gewisser Nachteil des Screening-Systems hinsichtlich der Vergleichbarkeit einzelner Wiederholungen im Vergleich zu Schüttelkulturen besteht. Diese Schwierigkeit konnte noch nicht gänzlich gelöst werden.

Die Korrelation von optischer Dichte und Zellzahl unterliegt zudem verschiedenen Faktoren. Der Entwicklungszyklus kann durch Nährstoffmangel und ungünstige Kulturbedingungen verlangsamt bzw. unterbrochen werden, wodurch die Synchronität der Kultur verloren gehen kann (Senger, 1961). Hierdurch kann es vorkommen, dass zum Zeitpunkt der Messung der optischen Dichte und der Zellzahlbestimmung die Algenzellen sich kurz vor der Teilung befinden, oder sich bereits geteilt haben. Auch wenn der Messzeitpunkt stets gleich gewählt wird, kann es vorkommen, dass die Teilungsverhältnisse nicht konstant abgebildet werden. Gerade bei Algenspezies mit hohem Zellvolumen ist dieser Effekt von Bedeutung, da in der Regel nur wenige Algenzellen in der Probe vorhanden sind. Weitere Messungenauigkeiten werden durch die für die Photometermessung notwendigen Verdünnungsreihen hervorgerufen. Auch bei der Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Thoma-Kammer kann es durch unterschiedliche Verteilungen der Algensuspension unter dem Deckglas zu Messungenauigkeiten kommen.

6.1.1.3 Begasung und Durchmischung

In Vorstudien wurden Begasungsvarianten getestet, die mittels eines im Einzelreaktor vorhandenen Schlauch oder über eine Nadel die Begasung durchführten. Diese Begasungsvarianten erwiesen sich in dem entwickelten Einweg-Photobioreaktor-System als ungünstig, da sich die Begasungseinheiten nach einer gewissen Zeit zusetzten. Da das Screening-System mit dem Airlift-Prinzip arbeitet, kommt es zu keiner Sedimentation der

Mikroalgen am Reaktorboden. Ebenso wird ein Anhaften der Mikroalgen an die Reaktorwand (fouling) verhindert. Dieses Phänomen wurde selbst bei einer Wachstumsperiode von 30 Tagen nicht beobachtet. Die Regelung der Luftversorgung der 25 Einzelreaktoren wurde mittels Schlauchklemmen durchgeführt. Die Einstellung der Durchflussmenge gestaltete sich in den Vorversuchen mit Belüftungsreglern anderer Fabrikate sehr schwierig. Erst der Einsatz der Schlauchklemmen ermöglichte eine gleichmäßige Begasung aller 25 Einzelreaktoren. Die Grundeinstellung jeder einzelnen Schlauchklemme bedarf eine gewisse Zeit, aber dafür musste nicht nach einem Wechsel der verschweißten Einzelreaktoren die Begasung neu eingestellt werden. Bei identischem Füllvolumen konnte die Begasungseinstellung vom Vorversuch übernommen werden.

Laut Carvalho et al. (2006) ist die Begasung vom Reaktorboden aus die am häufigsten benutzte Begasungsvariante. Um Ablagerungen am Reaktorboden zu vermeiden kann die Begasung benutzt werden. Hierfür muss diese aber eine kontinuierliche Strömung erzeugen (Becker, 1994). Eine Begasung vom Reaktorboden hat den Nachteil, dass die Verstopfungsgefahr durch ein Anhaften der Algenbiomasse (Biofouling) erhöht ist (Borowitzka, 1996). Die entwickelte Begasungseinheit bietet den Vorteil, dass der Luftauslass nicht mit der Kultur in Berührung kommt und somit die Kontaminationsgefahr im neu entwickelten Screening-System verringert ist. Auch der beschriebene Nachteil der Verstopfungsgefahr ist bei dem neu entwickelten System nicht gegeben, da durch die Knickfalz am Reaktormattenboden eine Verstopfung bei allen Versuchen verhindert wurde.

Algen, die sich mittels ihrer Flagellen selbst fortbewegen oder in ihrer Struktur sehr anfällig sind, reagieren gestresst auf eine Begasung (Silva et al., 1987; Camacho et al., 2000). Diese Algen eignen sich nicht für eine Kultivierung in Airliftreaktoren. Aus diesem Grund wurde eine Kultivierung von *D. salina* in einem Wippreaktor ohne Begasung erfolgreich durchgeführt. Hierdurch wurde der hydrodynamische Stress auf die Mikroalge vermindert. Die geringere Kohlendioxidkonzentration in dem geschlossenen Wippreaktor wurde durch die kurze Wachstumsperiode und durch Zugabe eines Carbonatpuffers (Ammoniumcarbonat 345 mg L^{-1}) ausgeglichen. Es ist bekannt, dass *D. salina* eine Carbonanhydraseaktivität besitzt und somit den Carbonatpuffer nutzen kann (Avron and Ben-Amotz, 1992).

6.1.1.4 Belichtung

Die PE-EVA-Matten haben eine sehr gute Transmission im PAR-Bereich von knapp über 90 %. In der Literatur werden für Photobioreaktoren aus Polycarbonat Werte von 90 % und für Photobioreaktoren aus Glas Werte kleiner als 90 % Transmission angegeben (Matzenberger, 2009). Da die Literaturwerte nicht spektral aufgelöst sind, können diese Werte nur sehr schwer mit der Transmission der PE-EVA-Matten verglichen werden. Aus diesem Grund wurde für mögliche Screeningreaktoren die Transmission, wie schon in Abschnitt 4.2.4 beschrieben, einheitlich bestimmt (siehe Abbildung 6.2).

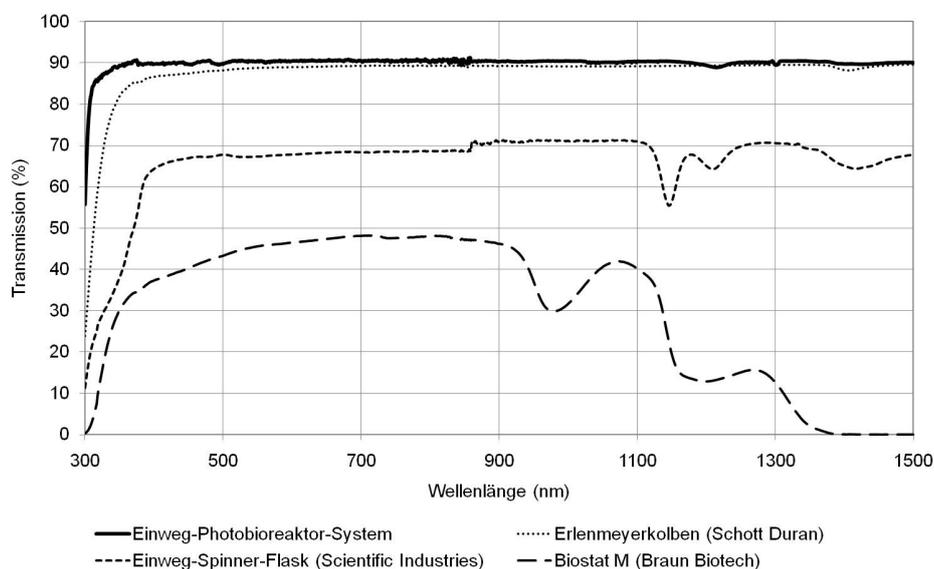


Abbildung 6.2: Transmission von Screeningreaktoren

Vergleicht man das neu entwickelte Einweg-Photobioreaktor-System mit einem Kulturflaschenreaktor (Erlenmeyerkolben), einem Einweg-Rührkesselreaktor (Spinner-Flask) und einem wassergekühlten Rührkesselreaktor aus Glas (Biostat M, Braun Biotech), so ergibt sich, eine Transmission im PAR-Bereich bei dem Kulturflaschenreaktor von 88,5 %, bei dem Einweg-Rührkesselreaktor von 67,4 % und bei dem wassergekühlten Rührkesselreaktor von 44,4 %. Die Transmissionseigenschaften der verschiedenen Reaktortypen unterscheiden sich auch in der Transmission im UV-Wellenlängenbereich sowie im NIR-Bereich. Der Vergleich zeigt, dass die Transmission im PAR-Bereich bei dem neu entwickelten Einweg-Photobioreaktor-System höher ist als bei den verglichenen Systemen. Lediglich die Erlenmeyerkolben haben eine ähnliche Transmissionskurve. Durch die hohe

Transmissionseigenschaft des Einweg-Photobioreaktor-Systems kann bei Zusatzbelichtung mit geringeren photosynthetischen Photonenflussdichten gearbeitet werden.

6.1.2 Sensorik-Prototyp

6.1.2.1 Aufbau

Durch den in Abbildung 5.6 dargestellten Messkopf konnte eine geeignete Positionierung der Lichtleiter sichergestellt werden. Da der Messkopf eine glatte Oberfläche besitzt, gleitet dieser sehr gut an der Anzuchtmatte, bei der Positionierung des Sensorsystems, entlang. Eine Positionsveränderung der Anzuchtmatte war auch bei mehrfacher Positionierung des Sensorsystems nicht zu beobachten. Auch die runde Form der einzelnen Matten bereitete keine Schwierigkeiten, da der Messkopf wie schon erwähnt sehr gut entlang der Anzuchtmatte glitt und die runde Anzuchtmatte somit immer plan vor dem Messkopf lag. Die Reproduzierbarkeit der Extinktions- und Chlorophyllfluoreszenzmessungen mit und ohne Begasung des Screeningsystems werden in Kapitel 5.1.2.2 und Kapitel 5.1.2.3 beschrieben. Hieraus geht hervor, dass die Begasung keinen Einfluss auf Extinktions- und Chlorophyllfluoreszenzmessungen hat.

Die Lichtleiter wurden in passgenau gearbeiteten Bohrungen mit Madenschrauben fixiert, so dass die beiden Lichtleiter sich in der gleichen horizontalen Ebene befanden. Hierdurch kam es zu keiner Abweichung vom geraden Lichtweg. Für die Umlenkung am Zangenende wurde ein 90°-Winkelstück verwendet, womit eine Messung zwischen den umgeschlagenen Mattenhälften ohne eine Verkantung des Lichtleiters ermöglicht wurde. Eine selbstständige Einspannung der Anzuchtmatte in den Zwischenraum des Messkopfes konnte nicht realisiert werden. Somit musste die Anzuchtmatte zu Versuchsbeginn jeweils per Hand einmal eingespannt werden. Anschließend wurde das Sensorsystem dahingehend programmiert, dass der Messkopf nach erfolgten Messungen nicht komplett aus der Matte entfernt, sondern an den Rand gefahren wurde, so dass die Matte eingespannt blieb, ohne dass es zu einer Beschattung der Kulturen durch die Zangenarme gekommen wäre. Die Zangenarme wurden aus Aluminiumstäben gefertigt und waren starr genug gearbeitet, dass eine Ebenenverschiebung der beiden Zangenarme nicht auftrat. Dies war ein Grundbaustein für die exakt gegenüberliegende Positionierung der Lichtleiter und garantierte eine praxistaugliche und robuste Online-Messung.

6.1.2.2 Funktionsweise

Die Handhabung der Messschiene für das Sensorsystem erwies sich als verlässlich und stabil. Das Gewicht des Messkopfes, sowie die Anbringung der Lichtleiter führte nicht zu einem Schleifen oder Stocken. Die zunächst in einer Vorstudie per Handrad und in der Endstudie automatisch durchgeführte Positionierung erwies sich als sehr genau und reproduzierbar. Betrug bei mehrmaliger Anfahrt der Positionierung per Handrad die Abweichung noch bis zu zwei Millimeter, so verringerte sich diese Abweichung durch die Verwendung eines Schrittmotors zur Justierung auf deutlich unter einen Millimeter.

6.2 Systemvalidierung anhand von Screeningbeispielen

6.2.1 Toleranzuntersuchungen

6.2.1.1 Funktionalität des Screening-Systems bei Toleranzuntersuchungen

Ziel von Toleranzuntersuchungen ist die Analyse typischer Wachstumsparameter (optimale Wachstumsrate bei Veränderung der PPF, Temperatur und Begasungsstärke) eines Organismus und welche quantitativen Auswirkungen dies für die an das Habitat angepassten Organismenpopulationen hat. Mit dem neu entwickelten Screening-System war es möglich, die typischen Eigenschaften zu ermitteln. In dem zur Systemvalidierung gewählten Beispielsversuch (Toleranzuntersuchungen von Mikroalgen gegenüber salinen Habitaten) wurden die Überlebensraten verschiedener Algenarten in Abhängigkeit eines salinen Abwassers sowie die Entwicklung der Biomasse ermittelt.

Die im Stand des Wissens in Tabelle 2.1 und Tabelle 2.2 beschriebenen Eigenschaften von Bioreaktoren bzw. Photobioreaktoren aus Einwegmaterialien dienen im Folgenden als Grundlage für die Bewertung des neu entwickelten Screening-Systems bei Experimenten aus dem Bereich der Toleranzuntersuchungen.

Lichteffizienz

Die Lichteffizienz des Gesamtsystems spielt bei der Untersuchung von salinen Habitaten zunächst eine untergeordnete Rolle, da es wie in der obigen Diskussion schon erwähnt, eher zu einem Lichtüberschuss als zu einem Lichtmangel in der Algensuspension kommt. Natürlich ist die effiziente Nutzung der eingesetzten Energie wichtig, damit die Betriebskosten nicht unnötig erhöht werden. Der Fokus der Lichteffizienz soll hierbei aber nicht

bei den Energiekosten liegen, sondern bei der Umsetzung der eingebrachten Lichtenergie durch die Photosynthese der Mikroalgen. Da, wie in der Diskussion schon erwähnt, die Mikroalgen eher bei einem Lichtüberschuss nicht wachsen, kann auf eine eventuell sehr aufwendige Lichteffizienzsteigerung im Voraus verzichtet werden. Ein wesentlicher Punkt bei einem Screeningsystem ist die Vergleichbarkeit der Wiederholungen. Durch das Auskristallisieren der Salze, Schaumbildung und Anheftung von abgestorbenen Mikroalgen wurde teilweise der Lichteintrag in den Reaktor durch diese Art der Beschattung verringert. Dieses Phänomen wurde durch das extrem saline Abwasser besonders hervorgerufen und resultierte in einem unregelmäßigen Lichteintrag.

Durchmischung und hydrologischer Stress

Der durch die Begasung der Mikroalgenkultur erzeugte hydrologische Stress erhöhte den schon durch das Abwasser bedingten Salzstress dermaßen, dass speziell bei einer Mikroalgenart (*D. salina*) ein Wachstum im neu entwickelten Screening-System nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte. Aus diesem Grund wurde diese Versuchsreihe in einem Wippreaktor ohne Begasung durchgeführt. Bei allen anderen Algenarten trat diese Besonderheit nicht auf. Die Durchmischung war bei den mit dem Airliftprinzip durchmischten Suspensionen immer gegeben. Sogar bei Salzablagerungen am Reaktorboden konnte eine Durchmischung der Algensuspension gewährleistet werden.

Volumen und Up-Scaling

Das Volumen einer Versuchseinheit des neu entwickelten Screening-Systems war für die Ermittlung der Überlebensrate und der Biomasse groß genug. Jedoch für die Messung des intrazellulären Ionengehaltes reichte die im Screening-System produzierte Biomasse nicht aus. Hierfür wurde ein Up-Scaling durchgeführt, wobei sich eine Veränderung der Wachstumsparameter nicht zeigte.

Sterilität und Sterilisierbarkeit

Bei den durchgeführten Versuchen mit salinen Abwässern wurde teilweise mit Bakterien kontaminiertes Abwasser verwendet. Trotz dieser Verunreinigungen wurden die Versuche unter quasi sterilen Bedingungen durchgeführt. Wenn zukünftig in dem Screening-Reaktor Aufsalzungsexperimente durchgeführt werden sollten, kann eine sterile Abwasserzuführung nicht gewährleistet werden. An dieser Stelle hat das neue Screening-System noch Schwächen und muss verbessert werden. Denkbar wären sterile Spritzensysteme, welche auch in der Humanmedizin eingesetzt werden.

Temperaturkontrolle

Versuchsbedingt gab es bei den Toleranzuntersuchungen von Mikroalgen gegenüber sali-

nen Habitaten keine besonderen Auffälligkeiten bei der Temperaturkontrolle.

Platzbedarf

Versuchsbedingt erhöhte sich der Platzbedarf bei der Durchführung der Experimente mit dem Wippreaktor. Es wurde ungefähr die doppelte Fläche für die gleiche Anzahl an Versuchswiederholungen benötigt im Vergleich zum Standardreaktor.

6.2.1.2 Toleranzuntersuchungen von Mikroalgen gegenüber salinen Habitaten

In den Salzschockexperimenten zeigten drei von zehn Algenarten ein Wachstum im Beisein des extrem salzhaltigen Abwassers (Abwassergehalt 50 - 75 %). Es konnte gezeigt werden, dass die Algen überleben und mit einer geringen Wachstumsrate ein Biomassezuwachs zu verzeichnen war. Von höheren Pflanzen ist bekannt, dass Nitrate und Chloride die gleichen Aufnahmemechanismen benutzen. Für die kombinierte Nitrat- und Chloridaufnahme wurden schon die verschiedensten Interaktionen beschrieben (Grattan and Grievé, 1994; Leidi et al., 1991). Durch den hohen Chloridgehalt im Medium, setzte eine Wachstumsdepression aufgrund der verringerten Nitrataufnahme ein. Ein weiterer Beweis für diese These geben die Versuche mit *T. tetrahele*. Hier zeigte die Mikroalge ein verbessertes Wachstum bei höheren Temperaturen und geringen Lichtintensitäten. Die Pigmentierung der Alge unter hohen Lichtintensitäten deutet auf ein Verbleichen durch Sauerstoff-Radikale (ROS) hin. Durch Schätzungen des C/N-Verhältnisses der Algenbiomasse kann berechnet werden, dass bei einer optimalen Nährstoffversorgung circa 30 % der Elektronen des photosynthetischen Elektronentransports für die Stickstoffreduktion benötigt wird. Unter Nitratmangel und einer hohen Lichtintensität ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass dies bei einem geringen Verbrauch an Elektronen in einer Mehler-Reaktion resultiert (Mehler, 1951; Makino et al., 2002). ROS werden angesammelt und können hierdurch zu einem Verbleichen der Pigmente oder anderen Zellschäden der Algen führen.

Nach einer Anpassungsperiode zeigte *D. salina* höhere Toleranzen zu dem verwendeten Abwasser und den beinhaltenden Salzkonzentrationen im Vergleich zu den Salzschockexperimenten. Die Anpassungsperiode kann die Expression neuer Enzyme ermöglichen, was zu einer Veränderung des Metabolismus führt und beispielsweise eine Erhöhung der Antioxidantien mit sich bringt. Auf diese Weise kann eine Ionen-Homeostase und Osmoadaption erreicht werden. Beispielsweise wurden Rubisco und Rubiscoactivase als Proteine bei der Stresskontrolle identifiziert (Liska et al., 2004). Ein effizienterer Calvin-

zyklus konkuriert mit der Mehler-Reaktion um Elektronen, bietet mehr Zucker, ATP und Redoxenergie für den Ionentransport und der Glycerinproduktion, was eine erfolgreiche Osmoregulation ermöglicht (Liska et al., 2004).

Eine Analyse des intrazellulären Ionengehaltes von Mikroalgen, welche in sehr salzhaltigen Medien gewachsen sind, ist anspruchsvoll. Auf der einen Seite ist eine Messmethode ohne „Waschschritt“ möglich. Diese Methode, welche auch in der vorliegenden Studie verwendet wurde, überschätzt besonders bei hohen extrazellulären Ionengehalten und Salzanhaftungen den intrazellulären Ionengehalt von Mikroalgenzellen. Auf der anderen Seite birgt eine Messmethode mit „Waschschritt“ den Nachteil, dass eine Lyse der Algenzelle oder eine Unterschätzung des intrazellulären Ionengehaltes stattfindet. Außerdem kann eine Verschiebung des Natrium zu Kalium-Verhältnisses durch den Waschschritt erfolgen. Aus diesem Grund wurde eine eventuelle Überschätzung des intrazellulären Ionengehaltes in Kauf genommen. Während der intrazelluläre Natriumgehalt von *D. salina* nicht signifikant von dem externen Salzgehalt beeinflusst wird, steigt der Kalium- und Magnesiumgehalt bei steigender Salzkonzentration im Wachstumsmedium. Dies unterstützt die These, dass saline Mikroalgen spezielle Ionentransporter besitzen, welche spezifische Ionen vom Transport ausschließen, um die Funktionalität der sensitiven Enzyme zu schützen (Avron and Ben-Amotz, 1992; Gimmler, 2000; Pick et al., 1986, 2006). Ein konstanter intrazellulärer Natriumgehalt ist besonders wichtig für *D. salina*, da wichtige Enzyme wie Rubisco, Glucose-6-phosphat-dehydrogenase und Pentosephosphatisomerase bei zu hohen intrazellulären Natriumgehalten gehemmt werden (Johnson et al., 1968). Aus diesem Grund entfernt *D. salina* Natrium aus der Zelle. Mit zunehmendem Salzgehalt des Wachstumsmediums findet eine Verschiebung des Kationengleichgewichtes von Natrium zu physiologisch kompatiblen Kalium- und Magnesiumionen statt.

6.2.2 Stoffstromanalyse

6.2.2.1 Funktionalität des Screening-Systems bei Stoffstromanalysen

Eine Stoffstromanalyse hat das Ziel, bekannte Inhaltsstoffe zu finden und deren Verlagerung zu untersuchen. Für die Systemvalidierung des neu entwickelten Screening-Systems wurde aus diesem Teilbereich des Screenings ein Beispielsversuch gewählt, welcher sich mit der Stoffstromanalyse der Nitrat- und Phosphatverlagerung in Algensuspensionen beschäftigt. Mit Hilfe des neu entwickelten Screening-Systems konnten bei verschiedenen

Algenarten der Wachstumsverlauf und die potentielle Quantenausbeute des PSII bei unterschiedlichen Abwasserkonzentrationen (Haushaltsabwässer) ermittelt werden. Weiterhin war es möglich die Verlagerung der Nitrat- und Phosphatkonzentration des Abwassers aufgrund von Extinktionsmessungen in die Algensuspension abzubilden.

Lichteffizienz

Bei der Analyse der Nitrat- und Phosphatverlagerung in Algensuspensionen in dem neu entwickelten Screening-System ist die Lichteffizienz von besonderer Bedeutung. Durch die im Haushaltsabwasser befindlichen Phosphate konnten hohe Biomassezuwächse erreicht werden. Aus diesem Grund ist ein ausreichender und gleichmäßiger Lichteintrag besonders wichtig. Durch den Einsatz von vorgeklärten Haushaltsabwässern gab es unterschiedliche Trübungen und somit auch unterschiedliche Lichteinträge bei den verschiedenen Versuchsvarianten. Dieses Phänomen wäre auch bei anderen Screening-Systemen aufgetreten. Weiterhin wurde bei den Experimenten beobachtet, dass durch das Haushaltsabwasser vermehrt eine Anheftung von Organismen an den Reaktorwänden stattfand. Diese Verringerung des Lichteintrags ist alleine der Funktionalität des neu entwickelten Screening-Systems geschuldet. Hierdurch wird die Anheftung durch das Reaktormaterial gefördert und kann mit Hilfe der Begasung nicht wieder von der Reaktorwand gelöst werden.

Durchmischung und hydrologischer Stress

Ein hydrologischer Stress, hervorgerufen durch die Begasung, konnte bei diesem Teilexperiment nicht beobachtet werden. Jedoch erfolgte durch die Begasung keine vollständige Durchmischung, da die groben Bestandteile des Haushaltsabwasser im Reaktor sedimentierten. Dieser Nachteil des Airliftprinzips wäre bei einem anderen Reaktortypen wie beispielsweise einem „Spinner Flask“ nicht aufgetreten.

Volumen und Up-Scaling

Das Volumen einer Versuchseinheit des neu entwickelten Screening-Systems war für die Ermittlung der Biomasse groß genug. Auch die Phosphat- und Nitratanalysen konnten mit dem bereitgestellten Medium durchgeführt werden. Ein Up-Scaling des Reaktortyps wurde bei dieser Versuchsreihe nicht durchgeführt. Ob die Übertragbarkeit der Versuche auf ein System in Indien gegeben ist, bleibt fraglich obwohl keine hohen technischen Voraussetzungen an das neu entwickelte Screening-System gestellt werden.

Sterilität und Sterilisierbarkeit

Bei den durchgeführten Versuchen mit Haushaltsabwässern wurde teilweise mit Bakterien kontaminiertes Abwasser verwendet. Durch die Begasung der Suspension konnte ein

Wachstum der Bakterien nicht verhindert werden. Dies ist jedoch nicht dem System geschuldet, sondern dem spezifischen Abwasser. Die Probenentnahme konnte hierbei nicht unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden. Zukünftige Systeme sollten in diesem Punkt verbessert werden.

Temperaturkontrolle

Versuchsbedingt gab es bei den Stoffstromanalyse der Nitrat- und Phosphatverlagerung in Algensuspensionen keine besonderen Auffälligkeiten bei der Temperaturkontrolle.

Sensorik

Eine Messung der potentiellen Quantenausbeute des PSII konnte in den ersten drei Versuchstagen nicht durchgeführt werden. Nach Angaben der Firma Walz muss für eine Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz wenigstens eine Chlorophyll-Konzentration von $500 \mu\text{g L}^{-1}$ vorhanden sein (Walz, 2011).

Es ist zu beobachten, dass besonders zwischen dem vierten und fünften Tag der Kultur die Nährstoffkonzentration im Medium sank. Während dieser Kulturzeit befanden sich die Mikroalgen in der exponentiellen Wachstumsphase (siehe Abbildung 5.14) und die potentielle Quantenausbeute des PSII hatte hier auch ihr Maximum (siehe Abbildung 5.15). Das Maximum der Lichtabsorption von Nitrat liegt bei 210 nm. Problem hierbei sind die organischen Verbindungen (Kölle, 2009). Die Modellierung der Nitrat- und Phosphatgehalte erfolgte auf der Basis der reproduzierbaren Extinktionsmessungen an den Reaktormatten.

6.2.2.2 Stoffstromanalyse der Nitrat- und Phosphatverlagerung in Algensuspensionen

Es wurde festgestellt, dass die Mikroalge *N. salina* sowohl in der Kontrolle als auch in allen Versuchsvarianten einen Biomassezuwachs verzeichnete. Die Versuchsvarianten N 25 bis N 100 zeigten einen anfänglich stärkeren Biomassezuwachs als die Kontrolle ohne Abwasserzusatz im Seawater-Medium. Dies könnte an der Verfügbarkeit der Nährstoffe gelegen haben. So waren wahrscheinlich die Nährstoffe in den Medien mit Abwasser einfacher verfügbar als im Seawater-Medium.

Die Nitrat- und Phosphatkonzentration im Medium reduzierte sich bei allen Varianten, außer bei der Variante N 100. Eine Nitrat- und Phosphatreduktion im Medium könnte aus

zwei Gründen zu Stande gekommen sein. Zum einen hätte der von den Mikroalgen produzierte Sauerstoff im Abwasser gelöst und hier von Bakterien benutzt werden können, welche dann wiederum für die Reinigung des Abwassers verantwortlich gewesen wären. Zum anderen hätten die Mikroalgen Nitrat und Phosphat für den Aufbau ihrer eigenen Biomasse nutzen können. Durch ihre hohen Wachstumsraten wird sehr viel Biomasse produziert, wodurch sehr viele Nährstoffe benötigt werden. Eine mögliche Quelle können hierfür Abwässer sein (De-Bashan and Bashan, 2010).

Bei der Messung der Nitrat- und Phosphatkonzentration wurde ein Verfahren angewendet, welches die Nährstoffkonzentrationsveränderungen im Medium gemessen hat. Es muss daher berücksichtigt werden, dass bei dieser Methode nicht zwischen einer Nährstoffreduktion im Medium durch Aufnahme von Mikroalgen und anderen Formen des Nährstoffverlustes (bakterieller oder chemischer Verlust) unterschieden werden konnte (Jimenez-Perez et al., 2004).

Am Ende der Kulturzeit starben die Mikroalgen ab, wobei hierdurch die eingelagerten Nitrate wieder an das Medium abgegeben wurden. Dies erklärt den leichten Konzentrationsanstieg an Nitrat bei manchen Versuchsvarianten zwischen dem sechsten und elften Kulturtag.

Im Gegensatz zur Nitratreduktion ist die Entfernung von Phosphaten der schwierigere Teil der Abwasserreinigung. Kommerziell eingesetzt werden heutzutage chemische Methoden mittels Einsatz von Eisen, Aluminium oder Kalk (Donnert and Salecker, 1999; Penetra et al., 1999). Biologische Methoden wie die Ausfällung von Phosphaten können nur unter ganz bestimmten Bedingungen durchgeführt werden (Bashan et al., 2004; Stratful et al., 1999; Van der Houwen and Valsami-Jones, 2001). Eine weitere Möglichkeit der biologischen Reinigung kann durch die Belüftung anaerober Abwässer mit CO_2 geschehen (Kalyuzhnyi et al., 2003).

Bei diesen Methoden werden die Phosphationen in eine feste Phase überführt und somit aus dem Abwasser entfernt. Ein Recyceln des Phosphates wird hierdurch jedoch nicht erreicht, da das Phosphat nur in andere Abfallprodukte umgewandelt wird. Der einzige Weg, Phosphat biologisch zu reinigen, wird durch Bakterien und Mikroorganismen erreicht (Bashan et al., 2004). Im Vergleich zur Nitratreduktion ist die Phosphatreduktion weniger effizient und verläuft sehr langsam (Aslan and Kapdan, 2006). Andere Studien zeigen bei landwirtschaftlichen Abwässern und dem Einsatz von *C. vulgaris* und *S. dimor-*

phus eine Phosphatreduktion von 55 % (Gonzalez et al., 1997). Eine weitere Studie mit einem anderen *Scenedesmus*-Stamm erreichte eine Phosphatreduktion von mehr als 50 % (Voltolina et al., 2005). Bei dem Einsatz von *S. platensis* konnte eine Phosphatreduktion von über 99 % erreicht werden (Phang et al., 2000).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Mikroalgen in der Lage sind, organische- und anorganische Substanzen vom Abwasser zu entfernen. Zum Beispiel benutzten Aslan and Kapdan (2006) *Chlorella vulgaris* für die Phosphat- und Nitratreinigung. Weitere Algenarten, die für die Abwasserreinigung eingesetzt werden, sind *Nannochloris*, *Spirulina* und *Scenedesmus* (Mata et al., 2010). Durch die hohe Salzkonzentration im Wachstumsmedium und die Ionentransportmechanismen der Algenzellen findet nur ein leichtes Wachstum unter diesen extremen Bedingungen statt. Aus diesem Grund ist eine direkte Abwasserreinigung in Abwässern mit sehr hohem Salzgehalt nicht möglich. Dieser hohe Salzgehalt muss zu einer verbesserten bzw. effizienteren schrittweisen Abwasserreinigung führen (Reinigung durch Umkehrosmose oder durch eine Reinigungs-Kaskade). Ein Problem der Abwasserreinigung durch Mikroalgen ist, dass die Mikroalgen in einer Suspension vorliegen. Dies erschwert in besonderem Maße die Algenernte bzw. die Abwassernachbehandlung. Durch Filterung oder Zentrifugation entsteht ein hoher finanzieller sowie zeitlicher Aufwand, welcher bei hohen Abwassermengen nicht realisierbar ist (De-Bashan and Bashan, 2010). Eine Immobilisierung der Mikroalgen ist die bisher beste Technik, eine Separation kostengünstig zu erreichen (Olguín, 2003).

6.2.3 Phäno- und Genotypisierung

6.2.3.1 Funktionalität des Screening-Systems bei Phäno- und Genotypisierungen

Phäno- und Genotypisierungen haben das Ziel, unbekannte Organismen zu charakterisieren und taxonomisch bzw. phylogenetisch einzuordnen. Durch das neu entwickelte Screening-System konnte der Teil der Phänotypisierung bei dem Beispielsversuch zur Systemvalidierung (Phäno- und Genotypisierung einer unbekanntes Algenspezies) abgearbeitet werden. Bei der Phänotypisierung spielen die physiologischen Untersuchungen eine zentrale Rolle. In dem Beispielsversuch konnten für den Teilbereich der Phäno- und Genotypisierung die spezifischen Wachstumsraten bei unterschiedlichen Kulturparametern ermittelt werden.

Wachstum und Beeinflussung durch den Screening-Reaktor

Durch die wenigen Mikroalgen in der Suspension neigte die Mikroalgenkultur eher zu einer Anheftung an die Reaktorröhrenwand.

Durchmischung und hydrologischer Stress

Ein hydrologischer Stress, hervorgerufen durch die Begasung, war bei diesem Teilexperiment von besonderer Bedeutung. Durch eine zu hohe Scherkraftbelastung hätte es zu Beschädigungen der Mikroalgen kommen können. Dies hätte zur Folge gehabt, dass die Aufnahmen des Rasterelektronenmikroskops nicht verwertet werden könnten. Die Durchmischung erfolgte wiederum mit dem Airliftprinzip durch die Begasung. Durch die Genotypisierung wurde eine Mischprobe aus zwei Algenarten festgestellt. Eine dieser Algenarten war die scherkraftanfällige *D. salina*, welche im ersten Teilexperiment schon erfolgreich im Wippreaktor kultiviert wurde. Wichtig in einem solchen Screeningversuch ist, dass nicht eine Mikroalge der Mischkultur durch die Kulturbedingungen bevorteilt wird und eine andere dadurch abstirbt. Hierdurch könnte eine Trennung von Mischproben herbeigeführt werden.

Volumen und Up-Scaling

Das Volumen einer Versuchseinheit des neu entwickelten Screening-Systems war für die Ermittlung der Biomasse groß genug.

Sterilität und Sterilisierbarkeit

Bei diesem Teilexperiment war die Sterilität einer der wichtigsten Faktoren der Untersuchung. Ein unsteriler Reaktor hätte dazu geführt, dass möglicherweise im Untersuchungszeitraum ein fremder Organismus in den Reaktor gelangt wäre. Dies hätte eine falsche DNA-Sequenz zur Folge gehabt.

Temperaturkontrolle

Versuchsbedingt gab es bei der Phäno- und Genotypisierung keine besonderen Auffälligkeiten bei der Temperaturkontrolle.

6.2.3.2 Phäno- und Genotypisierung einer unbekanntes Algenspezies

Die Aufnahmen des Rasterelektronenmikroskops geben einen Überblick über den Phänotypen der Mikroalge. Auffallend sind die vorhandenen glatten Flagellen und der rote Augenfleck. Aufgrund des hohen Salzgehaltes der Algensuspension und der direkten Auftragung dieser auf den Objekträger haben sich Salzkristalle gebildet, welche die Qualität der Aufnahmen verschlechterten. Weiterhin sind lediglich die Umrisse der Mikroalgen und keine plastischen Strukturen zu erkennen. Eine verbesserte Qualität bei der Aufnahme im

Elektronenmikroskop könnte durch eine vorherige Fixierung mit entsprechenden Fixaten verbessert werden (Mulisch, 2010). Neben der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung zeigte sich bei Betrachtung im Lichtmikroskop eine zweite seltene Mikroalge, die keine der üblichen Färbemethoden intakt überstand und ungefärbt wenig Kontrast gab.

Eine Charakterisierung der unbekanntes Algenspezies auf der Grundlage von phänotypischen Daten erfordert sehr viel Erfahrung des Betrachters. In diesem Fall kommen für die unbekanntes Mikroalge mit zwei glatten Flagellen, einem roten Augenfleck und einer hohen salinen Toleranz mehrere Spezies in Frage.

Um die Ergebnisse der Phänotypisierung zu ergänzen, wurde eine Aufreinigung mit einer anschließenden PCR und einer direkten Sequenzierung des PCR-Produktes durchgeführt. Diese direkte Methode birgt den Vorteil, dass schnell Ergebnisse erzielt werden gegenüber einer aufwendigen Klonierung. Diese wurde zwar auch durchgeführt um bessere Sequenzdaten zu erhalten, jedoch konnte rDNA der salzhaltigen Proben nicht kloniert werden. Wahrscheinlich kam es zu einer letalen Rekombinationen mit dem verwendeten Bakterienstamm. Die anschließende Sequenzierung erfolgte über Nacht bei einer Sequenzierungsfirma. Diese direkte und schnelle Methode hat den Nachteil, dass die Qualität der Sequenzierung gering ist. Ein Hintergrundrauschen auf den Chromatogrammen lässt sich nicht verhindern, was eine Leseweite von meist unter 700 bp zur Folge hat. Da der Sequenzierungsprimer direkt am PCR-Amplifikat ansetzt, ist eine Sequenzierung der ersten 10 bis 50 bp nicht möglich. Hiervon ist sowohl der Anfang wie auch das Ende der Sequenz betroffen. Dies könnte durch einen Zwischenschritt nach der PCR verbessert werden. Hierbei wird das PCR-Ergebnis in ein Plasmid integriert. Hierdurch wird eine vollständige Sequenzierung des PCR-Produktes gewährleistet, da die Sequenzierungsprimer komplett vor bzw. nach dem PCR-Produkt anlagern (Reinhard, 2010).

Mit der vorgestellten direkten Methode wurden Teilstücke der 18S rDNA aufgedeckt. Zwei Wiederholungen führten zu unterschiedlichen Ergebnissen. Es wurden die DNA-Sequenz einer Stramenopilen-Spezies als auch die einer Dunaliella-Spezies gefunden. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass es sich bei der untersuchten Algensuspension um eine Mischprobe aus zwei Algenspezies handelt, wie auch schon die lichtmikroskopische Betrachtung vermuten ließ.

Da die universellen Primer 2683 und 2684 unspezifisch an die 18S-Bereiche eukaryotischer DNA binden, ist es reiner Zufall an welche vorhandene eukaryotischer DNA diese in

einer Mischprobe binden (Medlin et al., 1988). Soll eine bestimmte DNA näher untersucht werden, helfen die universellen Primer nicht weiter (López-García et al., 2001). Abhilfe können hier selbst erstellte spezifische Primer geben. Mit Hilfe der durch die universellen Primer sequenzierten 18S-Bereiche können variable Bereiche der rDNA als Primerbindestelle gewählt werden. Diese spezifischen Primer sind nicht wie die universellen Primer sehr erprobt. Zwar können selbst erstellte Primer mit dem Programm „OligoCalc“ geprüft werden, aber dennoch kann eine falsche Annealing-Temperatur zu einem Scheitern der PCR führen (Kibbe, 2012).

Die ermittelte Sequenz der 1. Laufbahn ist als Isolat ME280100 von Park und Simpson (2010) hinterlegt worden. Diese Stramenopilen-Spezies wurde in Sorae, Südkorea aus einem stark salinen Habitat (280 ‰) isoliert. Die Spezies hat eine Zelllänge von $5,8 \pm 1,0$, eine Zellbreite von $3,7 \pm 0,6$ und zwei Flagellen ohne Mastigonema mit einer Länge von 1,5 mal der Zelllänge (Park and Simpson, 2010). Diese Daten stimmen gut mit denjenigen der hier untersuchten Spezies überein.

7 Schlussfolgerungen

In dieser Arbeit wurde ein Photobioreaktor-System aus Einwegmaterialien, welches für die Kultur von Mikroalgen geeignet ist, erfolgreich entwickelt. Ein Systemvergleich mit anderen Reaktoren zeigte ein besseres Wachstum im neu entwickelten Screening-Reaktor. Die Kombination aus hohem Probendurchsatz und hoher Reproduzierbarkeit konnte anhand von Vergleichsuntersuchungen belegt werden.

Die Funktionalität des Screeningsystems wurde anhand von ausgewählten Experimenten aus den Bereichen Toleranzuntersuchungen von Mikroalgen gegenüber salinen Habitaten, Stoffstromanalysen in Mikroalgensuspensionen bei Nitrat- und Phosphatverlagerungen und Phäno- und Genotypisierung einer unbekanntes Algenspezies durchgeführt. Die Ergebnisse der Vergleichs- sowie Funktionalitätsuntersuchungen zeigten, dass das entwickelte Screeningsystem eine Alternative bei Hochdurchsatzuntersuchungen im Mikroalgenbereich ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Kultivierung von Mikroalgen in dem System möglich ist und ein reproduzierbar arbeitendes Sensorsystem (Spektralanalyse und Chlorophyllfluorimetrie) vorliegt.

8 Ausblick

Eine kommerzielle Anwendung des Einweg-Photobioreaktor-Systems für Screeningaufgaben ist mittelfristig denkbar. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Prototyp des Screeningsystems verwendet. Sämtliche Bauteile, Vorrichtungen und Messinstrumente wurden einzeln hergestellt und auf das System abgestimmt. Um einen störungsfreien und immer reproduzierbaren Ablauf garantieren zu können, müssen die folgenden Punkte überarbeitet werden:

Bioreaktormatte: Die Bioreaktormatte, welche für dieses Screeningsystem verwendet wurde, wird industriell als Verpackungsmaterial hergestellt. Obwohl Material sowie die Abmessungen der Einzelreaktorröhren sehr gut sind, haben die Reaktorröhren keinen festen Zugang über die die Algensuspension zugeführt und belüftet werden kann. Für eine einfachere, sichere und sterile Benutzung des Screeningsystems ist eine Verbesserung der Bioreaktormatte unumgänglich. Für zukünftige Versuche mit diesem System muss eine Bioreaktormatte mit ähnlichen Eigenschaften gefunden werden, die aber Anschlüsse an den jeweiligen Enden der Reaktorröhren besitzt.

Des Weiteren ist ein wichtiger Bestandteil des Screeningsystems das Airliftprinzip, welches durch einen Druckabfall an der Knickfalte der Bioreaktormatte ausgelöst wird. Bei den durchgeführten Versuchen stellte sich heraus, dass bei unsachgemäßer Anbringung der Bioreaktormatte, die Knickfalte nicht sauber ausgebildet war und hierdurch ein unterschiedlicher Druckabfall in benachbarten Reaktorröhren entstand. Hierdurch veränderte sich die Begasung und musste manuell angepasst werden. Für eine zukünftige Bioreaktormatte sollte die Knickfalte zuvor industriell gefertigt werden um gleichbleibende und reproduzierbare Begasungsintensitäten zu gewährleisten.

Begasung: Bedingt durch die unsachgemäße Ausführung der Knickfalte, musste manuell die Begasungsintensität angepasst werden. Die Regulierung des Volumenstroms über Schiffsklemmen erweist sich nach der erstmaligen Grundeinstellung als praktikabel. Trotz der sehr hohen Investitionskosten sollte jede Reaktorröhre mit einem Durchflussmesser versehen werden.

Belichtung: Wie die Ergebnisse gezeigt haben, eignen sich Leuchtstofflampen nicht für eine gleichmäßige Belichtung aller Reaktorröhren. Eine Belichtung mittels LEDs verbessert nicht nur die Verteilung, sondern es können auch verschiedene Intensitäten und durch farbige LEDs auch andere Belichtungsspektren erzeugt werden.

Temperaturkontrolle: Die Temperatur konnte in allen Beispielsversuchen gleichmäßig gehalten werden. Es wurde eine Genauigkeit von $\pm 1K$ zur Solltemperatur erreicht. Bei höheren Ansprüchen kann der Temperatursensor in die Reaktormatte integriert werden.

Sensorik: Das verwendete Sensorsystem auf der gesteuerten Messschiene arbeitete genau und reproduzierbar. Hierfür mussten mehrere Programme der einzelnen Sensoren und Steuerungen aufeinander abgestimmt werden. Dieses wurde bisher mit dem Programm ProfiLab Expert realisiert. Lediglich eine automatische Datenerfassung aller Messparameter konnte mit diesem Programm nicht realisiert werden, da es nicht möglich war auf das Spektrometer zuzugreifen. Bei den durchgeführten Versuchen mussten die Spektraldaten extra erfasst und gespeichert werden. Für zukünftige Versuche wäre eine automatische Datenerfassung aller Parameter mit nur einem Programm wünschenswert. Dies gilt im Blick auf die Grundlagenforschung insbesondere auch für die Daten der Chlorophyll-Fluoreszenz. Es sollte die Möglichkeit bestehen, zunächst alle Rohdaten aufzunehmen und erst bei der Auswertung entsprechend zu verrechnen. So könnte man zum Beispiel prüfen, ob für eine bestimmte Fragestellung eher F_0/F_m , die Elektronentransportrate oder ein anderer Parameter als Indikator geeignet ist.

Weiterhin sollte geprüft werden, ob sich der Gas-Strom vor bzw. nach Durchlauf durch die Algensuspension online analysieren lässt. Es sollte auch überlegt werden, ob die Möglichkeit besteht, den pH-Wert und gelösten Sauerstoff online zu messen und nicht nach Entnahme einer Probe zu bestimmen.

Literaturverzeichnis

- Aaij, C. and Borst, P. (1972). The gel electrophoresis of dna. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 269(2):192–200.
- Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E., and Lipman, D. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3):403–410.
- An, J., Sim, S., Lee, J., and Kim, B. (2003). Hydrocarbon production from secondarily treated piggery wastewater by the green alga *Botryococcus braunii*. *Journal of applied phycology*, 15(2):185–191.
- Arbeit, R. (1995). Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. *Manual of clinical microbiology*, pages 190–208.
- Arnold, S., Gaensakoo, R., Harvey, L., and McNeil, B. (2002). Use of at-line and in-situ near-infrared spectroscopy to monitor biomass in an industrial fed-batch *escherichia coli* process. *Biotechnology and bioengineering*, 80(4):405–413.
- Aslan, S. and Kapdan, I. (2006). Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological Engineering*, 28(1):64–70.
- Atkins, P. and de Paula, J. (2006). *Physikalische Chemie, 4. vollständig überarbeitete Auflage*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- Avron, M. and Ben-Amotz, A. (1992). *Dunaliella: physiology, biochemistry, and biotechnology*. CRC Press, Florida.
- Baas-Becking, L. (1931). Salt effects on swarms of *dunaliella viridis* teod. *The Journal of General Physiology*, 14(6):765.
- Barsanti, L. and Gualtieri, P. (2006). *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. CRC Press, Florida.

- Bashan, Y., Holguin, G., and De-Bashan, L. (2004). Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology*, 50(8):521–577.
- Becker, E. (1994). *Microalgae: biotechnology and microbiology*, volume 10. Cambridge Univ Pr.
- Betts, J. und Baganz, F. (2006). Miniature bioreactors: current practices and future opportunities. *Microbial Cell Factories*, 5(1):21.
- Beutel, S. und Henkel, S. (2011). In situ sensor techniques in modern bioprocess monitoring. *Applied microbiology and biotechnology*, pages 1–13.
- Bland, J. and Altman, D. (1999). Measuring agreement in method comparison studies. *Statistical methods in medical research*, 8(2):135.
- Bluma, A., Höpfner, T., Prediger, A., Glindkamp, A., Beutel, S., and Scheper, T. (2011). Process analytical sensors and image-based techniques for single-use bioreactors. *Engineering in Life Sciences*, 11(6):550–553.
- Bornwasser, T. (2011). *Energieeffizienzsteigerung pflanzlicher Invitro-Kulturverfahren mit Hochleistungs-LED-Belichtungssystemen*. Leibniz Universität Hannover, Dissertation.
- Borowitzka, M. (1996). Closed algal photobioreactors: design considerations for large-scale systems. *Journal of Marine Biotechnology*, 4:185–191.
- Borowitzka, M. (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, and fermenters. *Progress in Industrial Microbiology*, 35:313–321.
- Brand, L. (1984). The salinity tolerance of forty-six marine phytoplankton isolates. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 18(5):543–556.
- Caemmerer, S. and Quick, W. (2004). Rubisco: physiology in vivo. *Photosynthesis*, 9:85–113.
- Camacho, F., Gómez, A., Sobczuk, T., and Grima, E. (2000). Effects of mechanical and hydrodynamic stress in agitated, sparged cultures of porphyridium cruentum. *Process Biochemistry*, 35(9):1045–1050.

- Carvalho, A., Meireles, L., and Malcata, F. (2006). Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnology progress*, 22(6):1490–1506.
- Changhai, W., Yingying, S., Ronglian, X., and Liqin, S. (2005). Effect of liquid circulation velocity and cell density on the growth of *parietochloris incisa* in flat plate photobioreactors. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 10(2):103–108.
- Cheung, Y. and Wong, M. (1981). Properties of animal manures and sewage sludges and their utilisation for algal growth. *Agricultural Wastes*, 3(2):109–122.
- Chmiel, H. (2011). *Bioprozesstechnik*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Berlin.
- De-Bashan, L. and Bashan, Y. (2010). Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresource technology*, 101(6):1611–1627.
- Di Termini, I., Prassone, A., Cattaneo, C., and Rovatti, M. (2011). On the nitrogen and phosphorus removal in algal photobioreactors. *Ecological Engineering*, 37(6):976–980.
- Dünnebier, K. (2006). *Oberflächen als Übertragungswege für Salmonellen in der Fleischgewinnung beim Schwein*. PhD thesis, Universitäts- und Landesbibliothek Bonn.
- Donnert, D. and Salecker, M. (1999). Elimination of phosphorus from waste water by crystallization. *Environmental Technology*, 20(7):735–742.
- Duetz, W. and Witholt, B. (2001). Effectiveness of orbital shaking for the aeration of suspended bacterial cultures in square-deepwell microtiter plates. *Biochemical engineering journal*, 7(2):113–115.
- Dumas, A., Laliberte, G., Lessard, P., and De La Noüe, J. (1998). Biotreatment of fish farm effluents using the cyanobacterium *Phormidium bohneri*. *Aquacultural engineering*, 17(1):57–68.
- Durmaz, Y., Monteiro, M., Bandarra, N., Gökpinar, Ş., and Işık, O. (2007). The effect of low temperature on fatty acid composition and tocopherols of the red microalga, *porphyridium cruentum*. *Journal of Applied Phycology*, 19(3):223–227.
- Eibl, R. und Eibl, D. (2009). *Disposable bioreactors*. Springer Verlag.

- Eriksen, N. T. (2008). The technology of microalgal culturing. *Biotechnology Letters*, 30(9):1525–1536.
- Eurofins (2011). Primer (oligonukleotide). <http://www.eurofins.de>.
- Falkowski, P. and Raven, J. (2007). *Aquatic photosynthesis 2nd Edition*. Princeton University Press, Princeton US.
- Fan, L., Zhang, Y., Cheng, L., Zhang, L., Tang, D., and Chen, H. (2007). Optimization of carbon dioxide fixation by *Chlorella vulgaris* cultivated in a membrane-photobioreactor. *Chemical engineering & technology*, 30(8):1094–1099.
- Fermentas (2011). Lambda/psti. <http://www.fermentas.de/>.
- Finnzymes (2011). Phusion flash high-fidelity pcr master mix. <http://www.finnzymes.fi>.
- Fiske, C. and Subbarow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *J. biol. Chem*, 66(2):375–400.
- Förster, T. (1982). *Fluoreszenz organischer Verbindungen*. Vandenhoeck and Ruprecht, Göttingen.
- Fuljahn, S. (2010). *Establishment of a photoautotrophic temporary immersion system (PA-TIS) in vitro*. Leibniz Universität Hannover, Dissertation.
- Gantt, E. (1975). Phycobilisomes: Light-harvesting pigment complexes. *BioScience*, JSTOR:781–788.
- Gibor, A. (1956). The culture of brine algae. *Biological Bulletin*, 111(2):223–229.
- Gimmler, H. (2000). Primary sodium plasma membrane atpases in salt-tolerant algae: facts and fictions. *Journal of experimental botany*, 51(348):1171.
- Glass, A. and Siddiqi, M. (1995). Nitrogen absorption by plant roots. *In: Nitrogen nutrition in higher plants*, New Delhi Associated Publishing Co, pages 21–56.
- Goering, R. (2000). The molecular epidemiology of nosocomial infection: past, present and future. *Reviews in Medical Microbiology*, 11(3):145.
- Gonzalez, L., Canizares, R., and Baena, S. (1997). Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. *Bioresource Technology*, 60(3):259–262.

- Graham, L., Graham, J., and Wilcox, L. (2009). *Algae Second Edition*. Pearson Education, Inc., USA.
- Grattan, S. and Grieve, C. (1994). Mineral nutrient acquisition and response by plants grown in saline environments. *Handbook of plant and crop stress*, pages 203–226.
- Grobbelaar, J., Nedbal, L., and Tichý, V. (1996). Influence of high frequency light/dark fluctuations on photosynthetic characteristics of microalgae photoacclimated to different light intensities and implications for mass algal cultivation. *Journal of applied phycology*, 8(4):335–343.
- Hagedorn, A., Levadoux, W., Groleau, D., and Tartakovsky, B. (2004). Evaluation of multiwavelength culture fluorescence for monitoring the aroma compound 4-hydroxy-2 (or 5)-ethyl-5 (or 2)-methyl-3 (2h)-furanone (hemf) production. *Biotechnology progress*, 20(1):361–367.
- Halama, M. (2009). *High-Throughput-Screening homogen katalysierter Hydrierungen im kontinuierlich durchströmten Membranreaktor*. PhD thesis, Dortmund.
- Hillis, D. and Dixon, M. (1991). Ribosomal dna: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology*, 66(4):411–453.
- Hoffmann, M. (2010). *Physiologische Untersuchungen parameterinduzierter Adaptionsantworten von Nannochloropsis salina in turbidostatischen Prozessen and deren biotechnologischer Potentiale*. PhD thesis, Kiel.
- Homeyer, U., Litek, K., Huchzermeyer, B., and Schultz, G. (1989). Uptake of phenylalanine into isolated barley vacuoles is driven by both tonoplast adenosine triphosphatase and pyrophosphatase: evidence for a hydrophobic l-amino acid carrier system. *Plant physiology*, 89(4):1388–1393.
- Hotos, G. (2003). Growth, filtration and ingestion rate of the rotifer brachionus plicatilis fed with large (asteromonas gracilis) and small (chlorella sp.) celled algal species. *Aquaculture Research*, 34(10):793–802.
- Hsin, C. (2006). *Gebrauchsmusterschrift: DE 20 2006 004 463 U1*. Bundesrepublik Deutschland; Deutsches Patent- and Markenamt.

- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., and Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal*, 54(4):621–639.
- Jaffe, H. and Miller, A. (1966). The fates of electronic excitation energy. *Journal of Chemical Education*, 43(9):469.
- Jiang, L., Luo, S., Fan, X., Yang, Z., and Guo, R. (2011). Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of co₂. *Applied Energy*, 88(10):3336–3341.
- Jimenez-Perez, M., Sanchez-Castillo, P., Romera, O., Fernandez-Moreno, D., and Perez-Martinez, C. (2004). Growth and nutrient removal in free and immobilized planktonic green algae isolated from pig manure. *Enzyme and microbial technology*, 34(5):392–398.
- John, G., Klimant, I., Wittmann, C., and Heinzle, E. (2003). Integrated optical sensing of dissolved oxygen in microtiter plates: a novel tool for microbial cultivation. *Biotechnology and bioengineering*, 81(7):829–836.
- Johnson, M., Johnson, E., MacElroy, R., Speer, H., and Bruff, B. (1968). Effects of salts on the halophilic alga *dunaliella viridis*. *Journal of bacteriology*, 95(4):1461.
- Kalyuzhnyi, S., Sklyar, V., Epov, A., Arkhipchenko, I., Barboulina, I., Orlova, O., Kovalev, A., Nozhevnikova, A., and Klapwijk, A. (2003). Sustainable treatment and reuse of diluted pig manure streams in russia. *Applied biochemistry and biotechnology*, 109(1):77–94.
- Karandashov, V. and Bucher, M. (2005). Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. *Trends in plant science*, 10(1):22–29.
- Kautsky, H., Appel, W., and Amann, H. (1960). Chlorophyll fluorescence and carbon assimilation. part xiii. the fluorescence and the photochemistry of plants. *Biochemische Zeitschrift*, 92:277–332.
- Kibbe, W. (2012). Oligo calc: Oligonucleotide properties calculator. <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>.

- Kirst, G. (1990). Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. *Annual review of plant biology*, 41(1):21–53.
- Kölle, W. (2001). *Wasseranalysen-richtig beurteilt*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Kölle, W. (2009). *Wasseranalysen-richtig Beurteilt: Grundlagen, Parameter, Wassertypen, Inhaltsstoffe*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Knoop, V. and Müller, K. (2008). *Gene Und Stammbaume: Ein Handbuch Zur Molekularen Phylogenetik*. Springer, Heidelberg.
- Lau, P., Tam, N., and Wong, Y. (1995). Effect of algal density on nutrient removal from primary settled wastewater. *Environmental Pollution*, 89(1):59–66.
- Leidi, E., Silberbush, M., and Lips, S. (1991). Wheat growth as affected by nitrogen type, pH and salinity. i. biomass production and mineral composition. *Journal of plant nutrition*, 14(3):235–246.
- Levasseur, M., Thompson, P., and Harrison, P. (1993). Physiological acclimation of marine phytoplankton to different nitrogen sources. *Journal of phycology*, 29(5):587–595.
- Li, Y., Chen, Y., Chen, P., Min, M., Zhou, W., Martinez, B., Zhu, J., and Ruan, R. (2011). Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. *Bioresource Technology*, 102(8):5138–5144.
- Lin, M. and Hsu, B. (2004). Photosynthetic plasticity of phaeocystis in response to different light environments. *Journal of plant physiology*, 161(11):1259–1268.
- Liska, A., Shevchenko, A., Pick, U., and Katz, A. (2004). Enhanced photosynthesis and redox energy production contribute to salinity tolerance in *Dunaliella* as revealed by homology-based proteomics. *Plant physiology*, 136(1):2806.
- López-García, P., Rodríguez-Valera, F., Pedrós-Alió, C., and Moreira, D. (2001). Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea antarctic plankton. *Nature*, 409(6820):603–607.
- Macherey-Nagel (2011). Gel-extraktion: Nucleospin extract ii. <http://www.mn-net.com>.

- Makino, A., Miyake, C., and Yokota, A. (2002). Physiological functions of the water–water cycle (mehler reaction) and the cyclic electron flow around psi in rice leaves. *Plant and cell physiology*, 43(9):1017.
- Manns, R. (1999). Microplate history, a presentation given at miptec-icar. *Nature Genetics Microarray Supplement*, 21.
- Mata, T., Martins, A., Caetano, N., et al. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1):217–232.
- Matzenberger, J. (2009). *Hydrothermale Vergasung von Algenbiomasse: Sensitivitätsanalyse der Methangestehungskosten*. GRIN Verlag, München.
- Maxwell, K. and Johnson, G. (2000). Chlorophyll fluorescence a practical guide. *Journal of experimental botany*, 51(345):659.
- Mazarevica, G., Diewok, J., Baena, J., Rosenberg, E., and Lendl, B. (2004). On-line fermentation monitoring by mid-infrared spectroscopy. *Applied spectroscopy*, 58(7):804–810.
- Medlin, L., Elwood, H., Stickel, S., and Sogin, M. (1988). The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16s-like rRNA-coding regions. *Gene*, 71(2):491–499.
- Mehler, A. (1951). Studies on reactions of illuminated chloroplasts: I. mechanism of the reduction of oxygen and other hill reagents. *Archives of biochemistry and biophysics*, 33(1):65–77.
- Meireles, L., Azevedo, J., Cunha, J., and Malcata, F. (2002). On-line determination of biomass in a microalga bioreactor using a novel computerized flow injection analysis system. *Biotechnology progress*, 18(6):1387–1391.
- Metting, F. (1996). Biodiversity and application of microalgae. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 17(5):477–489.
- Montaigne, F. (2002). Water pressure. *National Geographic*, 202(3):2–33.
- Moon-van der Staay, S., De Wachter, R., and Vaultot, D. (2001). Oceanic 18s rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity. *Nature*, 409(6820):607–610.

- Muhamad Shaleh, S. (2004). *Optimum Growth Parameters for Both Indoor and Outdoor Propagation of Microalgae, Chlorella Vulgaris and Isochrysis Galbana*. PhD thesis, Universiti Putra Malaysia.
- Mulisch, M. und Welsch, U. (2010). *Romeis Mikroskopische Technik*. Springer, Heidelberg.
- Munoz, R. and Guieysse, B. (2006). Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. *Water research*, 40(15):2799–2815.
- Nakayama, G. (1998). Microplate assays for high-throughput screening. *Current opinion in drug discovery & development*, 1(1):85.
- Nazarowec-White, M. and Farber, J. (1999). Phenotypic and genotypic typing of food and clinical isolates of enterobacter sakazakii. *Journal of medical microbiology*, 48(6):559–567.
- NCBI (2011). National center for biotechnology information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- Nedbal, L., Trtilek, M., Červený, J., Komárek, O., and Pakrasi, H. (2008). A photobioreactor system for precision cultivation of photoautotrophic microorganisms and for high-content analysis of suspension dynamics. *Biotechnology and bioengineering*, 100(5):902–910.
- OceanOptics (2011). Usb 4000, spektrometer. <http://www.oceanoptics.com>.
- Ohmori, K., Ehira, S., Kimura, S., and Ohmori, M. (2008). Changes in the amount of cellular trehalose, the activity of maltooligosyl trehalose hydrolase, and the expression of its gene in response to salt stress in the cyanobacterium spirulina platensis. *Microbes and environments*, 24(1):52–60.
- Okauchi, M. and Kawamura, K. (1997). Optimum medium for large-scale culture of tetraselmis tetrathele. *Hydrobiologia*, 358(1):217–222.
- Olguín, E. (2003). Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal processes. *Biotechnology advances*, 22(1-2):81–91.
- Oren, A. (2010). Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environmental technology*, 31(8):825–834.

- Oswald, W. and Golueke, C. (1960). Biological transformation of solar energy. *Advances in applied microbiology*, 2:223–262.
- Oswald, W., Lee, E., Adan, B., and Yao, K. (1978). New wastewater treatment method yields a harvest of saleable algae. *WHO chronicle*, 32(9):348.
- Park, J. and Simpson, A. (2010). Characterization of halotolerant bicosoecida and placididea (stramenopila) that are distinct from marine forms, and the phylogenetic pattern of salinity preference in heterotrophic stramenopiles. *Environmental Microbiology*, 12(5):1173–1184.
- Peña, M. and Villegas, C. (2005). Cell growth, effect of filtrate and nutritive value of the tropical prasinophyte tetraselmis tetrathele (butcher) at different phases of culture. *Aquaculture Research*, 36(15):1500–1508.
- Penetra, R., Reali, M., Foresti, E., and Campos, J. (1999). Post-treatment of effluents from anaerobic reactor treating domestic sewage by dissolved-air flotation. *Water science and technology*, 40(8):137–143.
- Perkampus, H.-H. (1986). *UV-VIS-Spektroskopie and ihre Anwendungen*. Springer-Verlag, Berlin.
- Pettersson, E., Lundeberg, J., and Ahmadian, A. (2009). Generations of sequencing technologies. *Genomics*, 93(2):105–111.
- Phang, S., Miah, M., Yeoh, B., and Hashim, M. (2000). Spirulina cultivation in digested sago starch factory wastewater. *Journal of applied phycology*, 12(3):395–400.
- PhotonSystemsInstruments (2011). Multi-cultivator mc 1000. <http://www.psi.cz>.
- Pick, U., Karni, L., and Avron, M. (1986). Determination of ion content and ion fluxes in the halotolerant alga dunaliella salina. *Plant physiology*, 81(1):92.
- Pick, U., Katz, A., Weiss, M., Levine, E. and Paz, K., and Ventrella, R. (2006). Survival at extreme salinity and iron deficiency. *Life Science Open Day, Weizmann Institute of Science*.
- Posten, C. (2009). Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Engineering in Life Sciences*, 9(3):165–177.

- Precht, M. and Kraft, R. (1993). Biostatistik 2, 5. völlig überarbeitete auflage.
- R (2006). R: A language and environment for statistical computing, r foundation for statistical computing. <http://www.r-project.org>, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.
- Raja, R., Hemaiswarya, S., Kumar, N., Ashok Sridhar, S., and Rengasamy, R. (2008). A perspective on the biotechnological potential of microalgae. *Critical Reviews in Microbiology*, 34(2):77–88.
- Rammert, M. and Pahl, M. (1991). Die löslichkeit von kohlendioxid in getränken. *Brauwelt*, 131:488–499.
- Rausch, C. and Bucher, M. (2002). Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta*, 216(1):23–37.
- Raven, P., Evert, R., Evert, R., Eichhorn, S., and Langenfeld-Heyser, R. (2000). *Biologie der Pflanzen*. Walter de Gruyter, Berlin.
- Rehbock, C., Beutel, S., Brückerhoff, T., Hitzmann, B., Riechers, D., Rudolph, G., Stahl, F., Scheper, T., and Friehs, K. (2008). Bioprozessanalytik. *Chemie Ingenieur Technik*, 80(3):267–286.
- Reinhard, T. (2010). *Molekularbiologische Methoden*. UTB / Ulmer, Stuttgart.
- Renaud, S. and Parry, D. (1994). Microalgae for use in tropical aquaculture ii: Effect of salinity on growth, gross chemical composition and fatty acid composition of three species of marine microalgae. *Journal of applied Phycology*, 6(3):347–356.
- Research, Z. (2011). The zr plant/seed dna miniprep. <http://www.zymoresearch.com>.
- Richmond, A. (2004). *A Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science Ltd., Weinheim.
- Richter, G. (1998). *Stoffwechselphysiologie der Pflanzen: Physiologie und Biochemie des Primär- and Sekundärstoffwechsels*. Georg Thieme Verlag, Leipzig.
- Robinson, J., Frame, E., and Frame, G. (2005). *Undergraduate instrumental analysis*. Wiley-CRC, Weinheim.

- Rottmayr, E.-M. (2001). *Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen der Tunika von Cystodytes dellechiajei DELLA VALLE (Urochordata, Ascidiacea)*. LMU München, Dissertation.
- SAG (2010). Kulturmedien: Experimentelle phykologie und sammlung von algenkulturen der universität göttingen. http://sagdb.uni-goettingen.de/cultureMedium/5_Seawater_Medium.pdf.
- Sanger, F., Coulson, A., Friedmann, T., Air, G., Barrell, B., Brown, N., Fiddes, J., Hutchison, C., Slocombe, P., Smith, M., et al. (1978). The nucleotide sequence of bacteriophage [phi] x174. *Journal of molecular biology*, 125(2):225–246.
- Sartorius-Stedim (2011). Midisart 2000 filter, sartorius-stedim. <http://www.sartorius-stedim.com>.
- Sato, K., Yoshida, Y., Hirahara, T., and Ohba, T. (2000). On-line measurement of intracellular atp of saccharomyces cerevisiae and pyruvate during sake mashing. *Journal of bioscience and bioengineering*, 90(3):294–301.
- Sawayama, S., Minowa, T., Dote, Y., and Yokoyama, S. (1992). Growth of the hydrocarbon-rich microalga Botryococcus braunii in secondarily treated sewage. *Applied microbiology and biotechnology*, 38(1):135–138.
- Schaberg, D., Tompkins, L., and Falkow, S. (1981). Use of agarose gel electrophoresis of plasmid deoxyribonucleic acid to fingerprint gram-negative bacilli. *Journal of clinical microbiology*, 13(6):1105.
- Scheper, T. and Schügerl, K. (1986). Characterization of bioreactors by in-situ fluorometry. *Journal of biotechnology*, 3(4):221–229.
- Schügerl, K., Lübbert, A., and Scheper, T. (1987). Online-prozessanalyse in bioreaktoren. *Chemie Ingenieur Technik*, 59(9):701–714.
- Schuegerl, K. (1997). *Bioreaktionstechnik: Bioprozesse mit Mikroorganismen und Zellen*. Birkhäuser Verlag, Berlin.
- Seckbach, J. (2007). *Algae and cyanobacteria in extreme environments*, volume 11. Springer Verlag, Hamburg.
- Seliger (2011). Seliger pumpentechnik gmbh. <http://www.seliger-gmbh.de>.

- Senger, H. (1961). Untersuchungen zur synchronisierung von chlorella-kulturen. *Archives of Microbiology*, 40(1):47–72.
- Seqlab (2011). Seqlab - sequence laboratories göttingen gmbh. <http://www.seqlab.de>.
- Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., and Roessler, P. (1998). *A look back at the U.S. Department of Energy's aquatic species program: biodiesel from algae*. NREL/TP-580-24190, National Renewable Energy Laboratory, USA.
- SI (2011). Scientificindustries, inc. <http://www.scientificindustries.com>.
- Silva, H., Cortifas, T., and Ertola, R. (1987). Effect of hydrodynamic stress on dunaliella growth. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 40(1):41–49.
- Skrabal, P. (2009). *Spektroskopie: Vom UV-bis zum NMR-bereich*. vdf Hochschulverlag AG, Zürich.
- Stitt, D., Nagar, M., Haq, T., and Timmins, M. (2002). Determination of growth rate of microorganisms in broth from oxygen-sensitive fluorescence plate reader measurements: Drug discovery and genomic technologies. *Biotechniques*, 32(3):684–689.
- Stratful, I., Brett, S., Scrimshaw, M., and Lester, J. (1999). Biological phosphorus removal, its role in phosphorus recycling. *Environmental technology*, 20(7):681–695.
- Suh, I. and Lee, C. (2003). Photobioreactor engineering: design and performance. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 8(6):313–321.
- Takaichi, S. (2011). Carotenoids in algae: Distributions, biosyntheses and functions. *Marine Drugs*, 9:1101–1118.
- Tam, N. and Wong, Y. (1989). Wastewater nutrient removal by *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus* sp. *Environmental Pollution*, 58(1):19–34.
- Tam, N. and Wong, Y. (1990). The comparison of growth and nutrient removal efficiency of *Chlorella pyrenoidosa* in settled and activated sewages. *Environmental Pollution*, 65(2):93–108.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011). Mega5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10):2731–2739.

- Tang, Y., Laidlaw, D., Gani, K., and Keasling, J. (2006). Evaluation of the effects of various culture conditions on cr (vi) reduction by shewanella oneidensis mr-1 in a novel high-throughput mini-bioreactor. *Biotechnology and bioengineering*, 95(1):176–184.
- Tillich, U., Grüber, S., and Frohme, M. (2012). Etablierung von hochdurchsatz-kultivierungs- und screeningmethoden für phototrophe einzeller. *Wissenschaftliche Beiträge 2012 TH Wildau*. <http://opus.kobv.de/tfhwildau/volltexte/2012/133/>.
- Trépanier, C., Parent, S., Comeau, Y., and Bouvrette, J. (2002). Phosphorus budget as a water quality management tool for closed aquatic mesocosms. *Water research*, 36(4):1007–1017.
- Ugwu, C. U., Aoyagi, H., and Uchiyama, H. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource technology*, 99(10):4021–4028.
- Van der Houwen, J. and Valsami-Jones, E. (2001). The application of calcium phosphate precipitation chemistry to phosphorus recovery: the influence of organic ligands. *Environmental technology*, 22(11):1325–1335.
- Venkat, N., De la Hoz Siegler, H., Shah, S., McCaffrey, W., and Ben-Zvi, A. (2011). Online sensor for monitoring a microalgal bioreactor system using support vector regression. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 110(1):38–48.
- Voelkening, S., Ohrenberg, A., and Duff, D. (2004). High throughput-experimentation in der materialforschung und prozessoptimierung. *Chemie Ingenieur Technik*, 76(6):718–722.
- Voltolina, D., Gómez-Villa, H., and Correa, G. (2005). Nitrogen removal and recycling by scenedesmus obliquus in semicontinuous cultures using artificial wastewater and a simulated light and temperature cycle. *Bioresource technology*, 96(3):359–362.
- Walz (2011). Junior-pam. <http://www.walz.com>.
- Weiss, S., John, G., Klimant, I., and Heinzle, E. (2002). Modelling of mixing in 96-well microplates observed with fluorescence indicators. *Biotechnology progress*, 18(4):821–830.
- Woertz, I., Feffer, A., Lundquist, T., and Nelson, Y. (2009). Algae grown on dairy and municipal wastewater for simultaneous nutrient removal and lipid production for biofuel feedstock. *Journal of Environmental Engineering*, 135:1115.

- Wold, S., Antti, H., Lindgren, F., and Öhman, J. (1998). Orthogonal signal correction of near-infrared spectra. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 44(1-2):175–185.
- Young, A., Britton, G., et al. (1993). *Carotenoids in photosynthesis*. Chapman and Hall Ltd, London.
- Zimmermann, H. (2005). *Entwicklung der Hochdurchsatzfermentation: Bestimmung der bioverfahrenstechnischen Anforderungen und Implementierung der Laborautomation*. PhD thesis, Rostock.
- Zimmermann, H., John, G., Trauthwein, H., Dingerdissen, U., and Huthmacher, K. (2003). Rapid evaluation of oxygen and water permeation through microplate sealing tapes. *Biotechnology progress*, 19(3):1061–1063.

9 Anhang

9.1 Genotypisierung

Sequenz der 1. Laufbahn:

GCTGCNAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTATAAGCCCTTGTACGGTGAAACT
GCCAATGGCTCATTAAATCAGTTATAATTTATTTGATAGTCTCTCTACTTGGA
TAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACATGCGTTAAATCCCTGTCAAGGGTGT
GTTTATTAGATCCTAACCAACACTTAAGGTGAATCATGATAACCGAACGAATC
GCCATTTGGCGATGTTTCATTCAAGTTTCTGCCCTATCAGCTTTCGATGGTAG
GGTATTGGCCTACCATGGCTTTAACGGGTAACGGAGAATTAGGGTTCGATTCC
GGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGT
AAATTACCCAATCCTAACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACGATACGGAA
CCCATCGGGTTTTGTAATTGGAATGAGTACAATTTAAATCCCTTAACGAGGAT
CCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAG
CGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAGCTCGTANNTGAATTTCTGGGAGGT
TCCANTCGCATGCNTGATTGCNTGNCNTGCTGTTGGATCTCCCCTCCTCGNAN
GGAANGTGTGTCGTTAATTCNTCNNANANTGNAANTGCNTCTTTTWNTGTGAA
AAANNTNNANTGNTT

Sequenz der 2. Laufbahn:

CTGNNAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTATAAACTGCTTATACTGTGAAACT
GCCAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTACCTTTACTCGGA
TAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAGG
GACGTATTTATTAGATAAAAGGCCAGCCGGGCTTGCCCGACTCTTGGCGAATC
ATGATAACTTCACGAATCGCACGGCTTCGTGCCGGCGATGTTTCATTCAAATT
TCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTGGTAACGG
GTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACC
ACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCAACACGGGGAGG

TAGTGACAATAAATAACAATACCGGGCATT TTTTGTCTGGTAATTGGAATGAGT
 ACAATCTNANTCCCTTAANNAGNATCCNTTGNANGGNNNGNCTNNTGCCNNCA
 NCNNNGNTNA

9.2 R-Code für die Vorhersage der Nährstoffgehalte

```

library(pls)
library(signal)
library(randomForest)
library(msProcess)
library(rms)
# Daten einlesen
setwd("G:\\Auswertung Statistik\\Versuch_2")
dat_abs<- read.table("Rohdaten_menke.txt", header=TRUE, sep="\t", na.strings = "NA", dec=",")
dat_abs_tr<-rbind(dat_abs[1:3,],dat_abs[5:7,],dat_abs[9:11,],dat_abs[12:13,],dat_abs[15:20,],dat_abs[21,],dat_abs[23:26,],dat_abs[28:32,],dat_abs[34:38,],
dat_abs[40,],dat_abs[42:43,],dat_abs[45:52,],dat_abs[64:69,],dat_abs[71:81,],dat_abs[83:87,],dat_abs[89,],dat_abs[91:94,],dat_abs[96:98,],dat_abs[100:102,],dat_abs[104:106,],
dat_abs[109:111,],dat_abs[113:116,],dat_abs[118:119,],dat_abs[121:124,],dat_abs[126:128,],dat_abs[130:133,],dat_abs[136:137,],dat_abs[139:140,])
dat_abs_test<-rbind(dat_abs[4,],dat_abs[8,],dat_abs[14,],dat_abs[22,],dat_abs[27,],dat_abs[33,],dat_abs[39,],
dat_abs[41,],dat_abs[44,],dat_abs[53:63,],dat_abs[70,],dat_abs[82,],dat_abs[88,],dat_abs[90,],dat_abs[95,],dat_abs[99,],dat_abs[103,],dat_abs[108,],
dat_abs[112,],dat_abs[117,],dat_abs[120,],dat_abs[125,],dat_abs[129,],dat_abs[134,],dat_abs[135,],dat_abs[138,])
matabs_tr <- dat_abs_tr[,-c(1:7)]
matabs_test <- dat_abs_test[,-c(1:7)]
mat_abs_s_tr<- scale(matabs_tr, scale = FALSE, center = colMeans(matabs_tr))
mat_abs_s_test<- scale(matabs_test, scale = FALSE, center = colMeans(matabs_test))
mat_abs_tr <- apply(mat_abs_s_tr, 1, sgolayfilt, m = 1)
mat_abs_test <- apply(mat_abs_s_test, 1, sgolayfilt, m = 1)
mat_abs_tr<-as.matrix(mat_abs_tr)
mat_abs_test<-as.matrix(mat_abs_test)
matabs_tr<-as.matrix(matabs_tr)
matabs_test<-as.matrix(matabs_test)
datmatabs_tr<-data.frame(Nitrat=dat_abs_tr$Nitrat,Phosphat=dat_abs_tr$Phosphat,NIR=I(matabs_tr))
datmatabs_test<-data.frame(Nitrat=dat_abs_test$Nitrat,Phosphat=dat_abs_test$Phosphat,NIR=I(matabs_test))
datmat_abs_tr<-data.frame(Nitrat=dat_abs_tr$Nitrat,Phosphat=dat_abs_tr$Phosphat,NIR=I(t(matabs_tr)))
datmat_abs_test<-data.frame(Nitrat=dat_abs_test$Nitrat,Phosphat=dat_abs_test$Phosphat,NIR=I(t(matabs_test)))
datmat_abs_p.pls_tr <- pls(Phosphat ~ NIR, data = datmat_abs_tr, ncomp = 5, validation = "LOO")
datmat_abs_p.pls_test <- pls(Phosphat ~ NIR, data = datmat_abs_test, ncomp = 5, validation = "LOO")
plot(datmat_abs_p.pls_tr, "validation", estimate = "CV") #3 comp
datmat_abs_n.pls_tr <- pls(Nitrat ~ NIR, data = datmat_abs_tr, ncomp = 5, validation = "LOO")
datmat_abs_n.pls_test <- pls(Nitrat ~ NIR, data = datmat_abs_test, ncomp = 5, validation = "LOO")
plot(datmat_abs_n.pls_tr, "validation", estimate = "CV") #3 comp
ww <- datmat_abs_p.pls_tr$loading.weights[,1]
pp <- datmat_abs_p.pls_tr$loadings[,1]
w.ortho <- pp - crossprod(ww, pp)/crossprod(ww) * ww
t.ortho <- datmat_abs_tr$NIR %*% w.ortho
p.ortho <- crossprod(datmat_abs_tr$NIR, t.ortho) / c(crossprod(t.ortho))
Xcorr_p <- datmat_abs_tr$NIR - tcrossprod(t.ortho, p.ortho)
ww <- datmat_abs_n.pls_tr$loading.weights[,1]
pp <- datmat_abs_n.pls_tr$loadings[,1]
w.ortho <- pp - crossprod(ww, pp)/crossprod(ww) * ww
t.ortho <- datmat_abs_tr$NIR %*% w.ortho
p.ortho <- crossprod(datmat_abs_tr$NIR, t.ortho) / c(crossprod(t.ortho))
Xcorr_n <- datmat_abs_n.pls_tr$NIR - tcrossprod(t.ortho, p.ortho)
datmat_abs.osc1 <- data.frame(Phosphat = datmat_abs_tr$Phosphat, Nitrat = datmat_abs_tr$Nitrat, NIR_p = Xcorr_p, NIR_n = Xcorr_n)
datmat_abs.opls1_p <-pls(Phosphat~NIR_p, data=datmat_abs.osc1, ncomp = 5, validation = "LOO")
datmat_abs.opls1_n <-pls(Nitrat~NIR_n, data=datmat_abs.osc1, ncomp = 5, validation = "LOO")
ww <- datmat_abs_p.pls_tr$loading.weights[,1]
pp <- datmat_abs_p.pls_tr$loadings[,1]
w.ortho <- pp - crossprod(ww, pp)/crossprod(ww) * ww
t.tst <- datmat_abs_test$NIR %*% w.ortho
p.tst <- crossprod(datmat_abs_test$NIR, t.tst) / c(crossprod(t.tst))
Xtst_p <- datmat_abs_test$NIR - tcrossprod(t.tst, p.tst)
datmat_abs_test_pred <- predict(datmat_abs.opls1_p, newdata=Xtst_p, ncomp=3)
mean(datmat_abs_test_pred)

```

```
RMSEP(datmat_abs_p.pls, newdata=datmat_abs_test, ncomp=3, intercept=FALSE)
R2(datmat_abs_p.pls, newdata=datmat_abs_test, ncomp=3, intercept=FALSE)
par(mfrow = c(1,2))
plot(datmat_abs.opls1_p, "validation", estimate = "CV", pch=16, ylab=("Vorhersagefehler (-)"), xlab=("Anzahl an Modellkomponenten (-)"), main=("")) #comp=2
plot(t(dat_abs_test[6]), datmat_abs_test_pred[1:36], pch=16, xlim=c(0,0.5), ylab=("vorhergesagter Phosphatgehalt (mM)"), ylim=c(0,0.5), xlab=("gemessener Phosphatgehalt (mM)"))
abline(0, 1, col = "gray")
plot(datmat_abs.opls1_p, "loading", comps = 1:2, xaxt="n", lty = c(1, 3), col = c(1, 1), ylab=("Ladungs-Vektor (-)"), xlab=("Wellenlänge (nm)"), main=(""))
axis(1, at=c(1,100,200,300,400,500), labels=c(350,450,550,650,750,850))
legend("topleft", lty = c(1,3), col = c(1,1), legend = c("Komponente 1 (84,0 %)", "Komponente 2 (2,1 %)"))
par(mfrow = c(1,2))
plot(scores(datmat_abs.opls1_p)[,1], Yscores(datmat_abs.opls1_p)[,1], xlab="X-Scores (-)", ylab="Y-Scores (-)")
abline(h=0, v=0, col="gray")
plot(scores(datmat_abs.opls1_p)[,2], Yscores(datmat_abs.opls1_p)[,2], xlab="X-Scores (-)", ylab="Y-Scores (-)")
abline(h=0, v=0, col="gray")
ww <- datmat_abs_n.pls_tr$loading.weights[,1]
pp <- datmat_abs_n.pls_tr$loadings[,1]
w.ortho <- pp - crossprod(ww, pp)/crossprod(ww) * ww
t.tst <- datmat_abs_test$NIR %*% w.ortho
p.tst <- crossprod(datmat_abs_test$NIR, t.tst) / c(crossprod(t.tst))
Xtst_n <- datmat_abs_test$NIR - tcrossprod(t.tst, p.tst)
datmat_abs_test_pred <- predict(datmat_abs.opls1_n, newdata=Xtst_n, ncomp=1)
mean(datmat_abs_test_pred)
RMSEP(datmat_abs_n.pls, newdata=datmat_abs_test, ncomp=1, intercept=FALSE)
R2(datmat_abs_n.pls, newdata=datmat_abs_test, ncomp=1, intercept=FALSE)
par(mfrow = c(1,2))
plot(datmat_abs.opls1_n, "validation", estimate = "CV", pch=16, ylab=("Vorhersagefehler (-)"), xlab=("Anzahl an Modellkomponenten (-)"), main=("")) #comp=2
plot(t(dat_abs_test[7]), datmat_abs_test_pred[1:36], pch=16, xlim=c(0,1), ylab=("vorhergesagter Nitratgehalt (mM)"), ylim=c(0,1), xlab=("gemessener Nitratgehalt (mM)"))
abline(0, 1, col = "gray")
plot(datmat_abs.opls1_n, "loading", comps = 1:2, xaxt="n", lty = c(1, 3), col = c(1, 1), ylab=("Ladungs-Vektor (-)"), xlab=("Wellenlänge (nm)"), main=(""))
axis(1, at=c(1,100,200,300,400,500), labels=c(350,450,550,650,750,850))
legend("topleft", lty = c(1,3), col = c(1,1), legend = c("Komponente 1 (78,6 %)", "Komponente 2 (1,4 %)"))
par(mfrow = c(1,2))
plot(scores(datmat_abs.opls1_n)[,1], Yscores(datmat_abs.opls1_n)[,1], xlab="X-Scores (-)", ylab="Y-Scores (-)")
abline(h=0, v=0, col="gray")
plot(scores(datmat_abs.opls1_n)[,2], Yscores(datmat_abs.opls1_n)[,2], xlab="X-Scores (-)", ylab="Y-Scores (-)")
abline(h=0, v=0, col="gray")
```

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name	Sebastian Menke
Geburtstag	09.09.1980
Geburtsort	Rheda-Wiedenbrück

Ausbildung

2008 - 2011	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biologische Produktionssysteme, Fachgebiet Biosystem- und Gartenbautechnik an der Leibniz Universität Hannover.
2008	M.Sc-Thema: Einfluss von Neem Azal -U und Neem-Pellet auf <i>Trialeurodes vaporariorum</i> und <i>Encarsia formosa</i> unter besonderer Berücksichtigung der biostatistischen Bewertung der Versuchsdaten mittels Generalisierter Linearer Modelle.
2006	B.Sc-Thema: Der Einfluss von Bodenbehandlungen mit Neem (Neem Azal -U und Neem-Pellet) auf Weiße Fliege an <i>Gerbera jamesonii</i> .
2003 - 2008	Studium der Fachrichtung Gartenbauwissenschaften an der Leibniz Universität Hannover
2001 - 2003	Ausbildung zum Gärtner bei der Firma Lütkemeyer in Gütersloh - Isselhorst.

Publikationen

- 2012 Menke, S., Sennhenn, A., Sachse, J.-H., Majewski, E., Huchzermeyer, B. and Rath, T., 2012: Screening of Microalgae for Feasible Mass Production in Industrial Hypersaline Wastewater Using Disposable Bioreactors. *Clean - Soil, Air, Water* 40(12):14011407.
- 2011 Menke, S., Seeniwasan, R., Huchzermeyer, B. and Rath, T., 2011: Screening of microalgae for wastewater purification. 1st World Student Conference on Environment and Sustainability, United Nations Environment Programme, Shanghai, China.
- Zagermann, S., Menke, S., Huchzermeyer, B. und Rath, T., 2011: Entwicklung einer Methodik zur nicht-invasiven Online-Bestimmung spektraler Charakteristika von Mikroalgen. *DGG-Proceedings*, Vol. 1:11, DOI: 10.5288/dgg-pr-01-11-sz-2011
- Menke, S., Huchzermeyer, B. und Rath, T., 2011: Einweg-Photobioreaktoren für das Screening von Mikroalgen. *VBIO* 16, 16-19.
- 2010 Menke, S. and Gerhard, D., 2010: Detection of Dose related differences in efficacy of Azadirachtin treatments for the control of whiteflies on *Gerbera jamesonii* by testing for interactions in generalized linear models. *Pest Management Science* 66(4):358-364.
- Menke, S., 2010: Salt Stress Adaptation of Microalgae. International Research Workshop on „New Innovations in Biotechnological Applications“. VIT-University, School of Bio Sciences and Technology, Vellore, Tamil Nadu, India.
- 2009 Menke, S., Sennhenn, A., Huchzermeyer, B. und Rath, T., 2009: Biologische Reduktion und naturverträgliche Nutzung der Salzfracht von Abraumhalden. Abschlussbericht zum Mikroalgen-Teil des

Industrie-Projektes (Projekt Nr.: 60420353) mit der KundS AG.

Menke, S., Poehling, H.-M. and Gerhard, D., 2009: An application of generalized linear model based multiple comparison procedures to greenhouse pest regulation experiments. Greensys 2009, Acta Horticulturae 893:2 1233-1238.

Menke, S., 2009: Einfluss von Neem Azal-U und Neem-Pellet auf *Trialeurodes vaporariorum* und *Encarsia formosa* unter besonderer Berücksichtigung der biostatistischen Bewertung der Versuchsdaten mittels generalisierter linearer Modelle. 45. Gartenbauwissenschaftliche Tagung, Berlin. BHGL-Schriftenreihe. BHGL, Bonn, Deutsche Gartenbauwissenschaftliche Gesellschaft, Hannover.

Menke, S., Hoffmann, H. und Zutz, K., 2009: Energetische Bewertung eines geschlossenen Gewächshauses mit Aquiferspeicher. 45. Gartenbauwissenschaftliche Tagung, Berlin. BHGL-Schriftenreihe. BHGL, Bonn, Deutsche Gartenbauwissenschaftliche Gesellschaft, Hannover.

2006

Menke, S., 2006: Bau eines kleinen, bivalenten Blockheizkraftwerkes für das Wohnheim Wilhelm Busch Straße des Studentenwerks Hannover. Eingereichte Arbeit für den ersten Preis beim Energiespar-Wettbewerb: Energiepreis - Wettbewerb in den Wohnheimen. Studentenwerk Hannover / Stadtwerke Enercity Hannover.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Personen bedanken, die mir die Promotion ermöglicht haben.

Zu Allererst danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Rath für die Anstellung als wissenschaftlicher Mitarbeiter, die Bereitstellung des Themas, sowie die Hilfestellung bei aufkommenden Fragen. Ich verdanke Ihm darüber hinaus jede hilfreiche Unterstützung und viele anregende Diskussionen. Jede Phase dieser Arbeit wurde von Ihm intensiv und professionell begleitet. Besonders bedanken will ich mich auch für die Freiheit, die er mir während des gesamten Forschungsprojektes gewährte. Dieses hat zum maßgeblichen Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Der kompetente Rat und die persönliche Hilfe kam mir in zahlreichen Problemstellungen sehr zugute.

Mein zusätzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bernhard Huchzermeyer. Jederzeit gewährte er mir bei der Planung, Durchführung und Auswertung der vorliegenden Arbeit sachkundige, erfahrene und wertvolle Unterstützung. Seine wegweisenden und kreativen Ideen haben besonders zum physiologischen Teil dieser Arbeit beigetragen.

Weiterhin möchte ich meinen Kollegen des Fachgebiets Biosystem- und Gartenbautechnik dafür danken, dass sie mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen und die Geduld aufgebracht haben, meine wiederkehrenden Fragen zu beantworten.

Meinen Eltern Annette und Albert Menke gilt ein besondere Dank, dass sie mir das Studium der Gartenbauwissenschaften ermöglicht haben und mir durch positive Impulse auftretende Zweifel ausgeräumt wurden.

Vielen Dank Babsy, dass du diese Arbeit mit großer Geduld begleitet und immer an mich geglaubt hast.

Erklärung zur Dissertation

Hierdurch erkläre ich, dass ich meine Dissertation selbstständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls die zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Die Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet.

Sebastian Menke