Metagenomische und physiologische Analysen der Interaktion zwischen Mikroalgen und Bakterien in Photobioreaktoren

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften

des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik, Informatik und

Naturwissenschaften,

der Universität Hamburg

vorgelegt von

Ines Krohn-Molt

Hamburg, 2013

Genehmigt vom Fachbereich Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg auf Antrag von Professor Dr. D. HANELT Weiterer Gutachter der Dissertation: Professor Dr. W. STREIT Tag der Disputation: 22. November 2013

Hamburg, den 12. November 2013

Professor Dr. C. Lohr Vorsitzender des Fach-Promotionsausschusses Biologie

Zusammenfassung

Photobioreaktoren (PBRs) stellen eine wichtige Form der Sonnenlicht-abhängigen CO_2 -Fixierung im technischen Maßstab dar. Ein Hauptproblem dabei ist, dass es in nichtaxenischen Kulturen durch Bakterien, welche in der Regel mit den Mikroalgen assoziiert sind, zur Bildung lichtundurchlässiger Biofilme kommt und somit die Produktivität der Mikroalgen stark beeinträchtigt wird.

In der vorliegenden Studie wurde erstmalig die zeitabhängige Biofilmentwicklung und die Veränderung der Zusammensetzung der bakteriellen Populationen der Mikroalgen *Scenedes-mus obliquus* und *Chlorella vulgaris* in einem Modellreaktor im Detail untersucht. Die biochemischen und chemischen Komponenten der Biofilmmatrix setzten sich hauptsächlich aus neutralen und sauren Polysacchariden (11,60 mg/g Biofilm), Fett-säuren (10,40 mg/g Biofilm), Proteinen (3,77 mg/g Biofilm), Uronsäuren (0,82 mg/g Biofilm) und sehr geringe Mengen an DNA (< 4 ng/mg Biofilm) zusammen. Die Populationsdynamik der bakteriellen Gemeinschaft wurde mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) und Untersuchungen der 16S rRNA-Gensequenzen analysiert. Insgesamt ist die Vielfalt mit ca. 30 zugeordneten Bakterienarten eher limitiert. Die Mehrheit dieser Mikroorganismen wurde zu Vertretern der Alpha- und Betaproteobacteria sowie den Bacteroidetes zugeordnet.

Durch einen kombinierten Ansatz der Sequenzierung über "GS FLX Titanium von Roche" und "HiSeq 2000 von Illumina" konnte ein Datensatz von 350 Mbp assemblierter DNA generiert werden. Die Auswertung dieser Daten deutete auf eine hohe meta-bolische Vielfalt hin. Innerhalb des Metagenoms waren viele Stoffwechselwege und Gene vorhanden, welche Sequenzhomologien für die Verwertung von Polymeren sowie aromatischen und nichtaromatischen Verbindungen zeigten. Interessanterweise wurde zudem eine relativ hohe Anzahl von Genen identifiziert, welche für Esterasen und Lipasen kodierten. Darüber hinaus konnten Sequenzhomologien zu Genen ermittelt werden, die für die Biosynthese von B-Vitaminen relevant sind. Da Mikroalgen selbst zumeist keine B-Vitamine (Cobalamin, Thiamin und z.T. Biotin) synthetisieren können, implizieren diese Ergebnisse, dass die metabolischen Leistungen der bakteriellen Populationen unerlässlich für das Wachstum und die Stabilität der Algenkultur sind. Sie deuten aber auch daraufhin, dass die Bakterien die von den Algen produzierten und freigesetzten Exsudate verstoffwechseln können. Im Zuge einer weiteren Charakterisierung des Biofilmmetagenoms wurde aus der isolierten DNA eine 14.976 Klone umfassende Fosmidbank konstruiert. Die durchschnittliche Insertgröße betrug 30-35 kb, welches ca. 524 Mbp an klonierter DNA entspricht. Durch funktionelle Testverfahren konnten erste Einblicke in die Enzym-aktivität der in dem Photobioreaktor vorkommenden Bakterien gewonnen werden. So wurden 68 putativ positive Klone gefunden, die Esterase/Lipase - Aktivität zeigten. Die Zellrohextrakte von 16 dieser Fosmid-klone bestätigten, dass eine breite Palette von Fettsäuren mit unterschiedlicher Kettenlänge verstoffwechselt werden kann.

Kultivierungsabhängige Untersuchungen bestätigten diese Ergebnisse. So konnte direkt in zellfreien Überständen der Mikroalgenkultur Esterase/Lipase - Aktivität sowie die B-Vitamine Cobalamin (B12) und Biotin (B7) nachgewiesen werden. Parallel hierzu wurden auch Untersuchungen zur Kultivierung und Isolierung einzelner Bakterienarten aus dem Mikroalgen-Bakterien-Konsortium durchgeführt. Anfängliche Versuche resultierten in der Isolierung von zwei Reinkulturen. Erst nach Zugabe von 5-50% (v/v) der Mikroalgenkultur konnten sechs weitere Bakterienarten isoliert werden.

Vor dem Hintergrund, dass Biofilme die Photosyntheseaktivität und somit die Produktivität der Mikroalgenkultur negativ beeinflussen, wurden im Laufe dieser Arbeit zwei Screeningmethoden entwickelt, die zur Identifizierung von Biofilm-inhibierenden Syntheseprodukten aus Metagenombanken führen sollten. Insgesamt konnten 10 aktive Fosmidklone ermittelt werden, deren Zellrohextrakte eine inhibierende Wirkung auf die Biofilmbildung von Grampositiven und -negativen Bakterien zeigten.

Somit konnte im Rahmen dieser Arbeit eine umfassende Charakterisierung der phylogenetischen Zusammensetzung sowie des metagenomischen und physiologischen Potentials von Algen-assoziierten Bakterien erarbeitet werden. Zudem wurde deutlich, dass es sich bei der Interaktion der Bakterien mit den Algen um eine sehr fein abgestimmte Biozönose handelt, wobei die Bakteriengemeinschaft die Mikroalgen mit essentiellen B-Vitaminen versorgt und im Gegenzug die Mikroalgen den heterotrophen Bakterien komplexe Kohlenstoffverbindungen zur Verfügung stellten.

Abstract

Photobioreactors (PBRs) are an important form of sunlightdependent CO_2 - fixation on an industrial scale. One major problem is that bacteria in non-axenic cultures, which are usually associated with microalgae, form opaque biofilms and thereby affect the productivity of the microalgae significantly.

In the present study time-dependent biofilm development and changes in the composition of bacterial population of the micro-algae *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris* in a modelreactor were analysed in detail for the first time. The biochemical and chemical components of the biofilm matrix consisted mainly of neutral and acidic polysaccharides (11.60 mg/g biofilm), fatty acids (10.40 mg/g biofilm), proteins (3.77 mg/g biofilm), uronic acids (0.82 mg/g biofilm) and only traces of DNA (< 4 ng/mg biofilm). The population dynamics of the bacterial community was determined by scanning electron microscopy (SEM) and sequencing of the 16S rRNA genes. In general, the diversity was rather limited with approximately 30 bacterial species. The majority of these microorganisms have been assigned to representatives of Alpha-, and Betaproteobacteria and Bacteriodetes.

Through a combined approach of sequencing by "GS FLX Titanium Roche" and "HiSeq 2000 from Illumina" resulted in the overall production of 350 Mbp of sequenced DNA. The analysis of these data indicated a high metabolic diversity. Within the metagenome, many metabolic pathways and genes were present, which showed sequence homologies for the utilization of polymers and aromatic and non-aromatic compounds. Interestingly, also a relatively large number of genes have been identified which encode for esterases and lipases. In addition, sequence homologies to genes could be detected, which are relevant for the biosynthesis of B-vitamins. Since most microalgae cannot synthesize B-vitamins (cobalamin, thiamine and biotin in some cases), these results imply that the metabolic activities of bacterial populations are essential for the growth and stability of algal culture. But they also suggest that the bacteria can metabolize the exudates produced and released by the algae.

In order to further characterize the biofilm metagenome, a comprehensive fosmid metagenome library comprising 14,976 clones was constructed from the isolated DNA. The average insert size was 30-35 kb., which corresponds to approximately 524 Mbp of cloned DNA. Through functional screening procedures, insights into enzyme activity of the bacteria occurring in the photo-bioreactor were gained. Through this, 68 clones that were assumed to be positive were found to show esterase/lipase activities. The crude cell extract of 16 of these fosmid clones confirmed that a wide range of fatty acids of different chain lengths can be metabolized.

Cultivation-dependent analysis confirmed these results. Esterase/lipase activity, as well as the B-vitamins cobalamin (B12) and biotin (B7) could be detected directly in cell-free supernatants of microalgae culture. In parallel, studies of cultivation and isolation of individual bacterial species from the microalgae-bacteria-consortium were performed. Initial attempts resulted in the isolation of two pure cultures. Only a addition of 5-50% (v/v) of the microalgae culture, growth of another six bacterial organisms was stimulated.

In consideration that biofilms negatively affect the photosynthetic activity and thus the productivity of microalgae culture, two screening methods were developed in this study, which should lead to the identification of biofilm-inhibiting synthesis products from metagenomic libraries. A total of 10 active fosmid clones were identified, whose crude cell extract showed an inhibitory effect on biofilm formation of Gram - positive and - negative bacteria.

Thus, a comprehensive characterization of the phylogenetic composition of the metagenomic and physiological potential of algae-associated bacteria could be developed within the framework of this study. It was also apparent that the interaction between bacteria and algae is a very finely balanced biological biocenosis, in which the bacterial community supplies the micro-algae with essential B-vitamins, and the microalgae in turn supplied the heterotrophic bacteria with complex carbon compounds.

Inhaltsverzeichnis

| Inhaltsverzeichnis I- | | | I-V |
|-----------------------|---|--|------|
| Abbildungsverzeichnis | | | VI |
| Tabel | llenverz | zeichnis | VIII |
| Abkü | rzungs | verzeichnis | IX |
| 1 Ei | inleitun | g | 1 |
| 1.1 | Indust | rielle Nutzung von Mikroalgen | 1 |
| 1.2 | Biofil | me in industriell genutzten Habitaten | 2 |
| 1.3 | Biofil | mentwicklung | 3 |
| 1.4 | Mikroalgen und Bakterien als Gemeinschaft | | |
| 1.5 | Analyse bakterieller Populationen | | |
| 1.6 | Zielsetzung | | |
| 2 M | Material und Methoden | | |
| 2.1 | Bakte | rienstämme, Vektoren und Primer | 11 |
| 2.2 | Chemikalien | | |
| 2.3 | Nährn | nedien und Zusätze | 13 |
| | 2.3.1 | "Flory-Medium" zur Kultivierung der Mikroalgen Scenedesmus | |
| | | obliquus und Chlorella vulgaris | 13 |
| | 2.3.2 | Medium zur Anreicherung und Isolierung von Mikroorganismen | |
| | | aus der Mikroalgen-Bakterien Kultur | 13 |
| | 2.3.3 | Vollmedium | 14 |
| | 2.3.4 | Antibiotika und andere Medienzusätze | 16 |
| 2.4 | Photo | bioreaktoren | 17 |
| | 2.4.1 | Algenkultivierung | 18 |
| | 2.4.2 | Probennahme | 18 |

| 2.5 | Mikrobiologische Arbeitsmethoden | | | |
|-----|----------------------------------|--------|---|----|
| | 2.5.1 | Stam | mhaltung der Bakterien | 18 |
| | 2.5 | 5.1.1 | Anlegen von Glycerin-Stammkulturen | 18 |
| | 2.5 | 5.1.2 | Anlegen von Agar-Stammplatten | 18 |
| | 2.5.2 | Nach | weis von B-Vitaminen (Biotin, B7 und Cobalamin, B12) | 19 |
| | 2.5.3 | Anzu | cht von Biofilmen in Mikrotiterplatten | 20 |
| | 2.5.4 | Mikro | oskopische Untersuchungen | 20 |
| | 2.5 | 5.4.1 | Fluoreszenzmikroskopie (FISH) | 20 |
| | 2.5 | 5.4.2 | Rasterelektronenmikroskopie (REM) | 23 |
| | 2.5 | 5.4.3 | Negativkontrastierung | 24 |
| | 2.5.5 | Isolie | rung von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) des | |
| | | Mikro | oalgen-Bakterien Biofilms | 24 |
| 2.6 | Molekulare Arbeitsmethoden | | | |
| | 2.6.1 | Behai | ndlung von Geräten und Lösungen | 24 |
| | 2.6.2 | Bestin | mmung der DNA-Konzentration und -Reinheit | 25 |
| | 2.6.3 | Gelel | ektrophorese | 25 |
| | 2.6 | 5.3.1 | Agarosegelelektrophorese | 25 |
| | 2.6 | 5.3.2 | Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) | 26 |
| | 2.6.4 | Isolie | rung von Nukleinsäuren | 28 |
| | 2.6 | 5.4.1 | Isolierung von Gesamt-DNA aus den Reaktorproben | 28 |
| | 2.6 | 5.4.2 | Präzipitation von Nukleinsäuren | 30 |
| | 2.6 | 5.4.3 | Isolierung von Fosmid-DNA | 30 |
| | 2.6.5 | Polyn | nerase-Kettenreaktion (PCR) | 31 |
| | 2.6 | 5.5.1 | Primer | 32 |
| | 2.6 | 5.5.2 | PCR-Ansatz | 32 |
| | 2.6 | 5.5.3 | Amplifikation der 16S rRNA-Gensequenzen | 32 |

| | 2.6.5.4 | Aufreinigung der PCR-Produkte | 33 |
|-----|------------------------|--|----|
| | 2.6.6 Enzy | matische DNA-Modifikation | 33 |
| | 2.6.6.1 | Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendo- nukleasen | 33 |
| | 2.6.6.2 | Ligation von Vektor und Fragment-DNA | 34 |
| | 2.6.7 Trans | sformationsverfahren | 35 |
| | 2.6.7.1 | Transformation von chemisch kompetenten Escherichia coli-Zellen | 35 |
| | 2.6.7.2 | Transduktion mit dem Copy Control TM Fosmid Libary Production Kit | 36 |
| | 2.6.8 Seque | enzierung | 37 |
| | 2.6.8.1 | Sequenzierung von Insert-DNA aus Plasmid-Vektoren | 37 |
| | 2.6.8.2 | Sequenzierung mittels FLX 454 | 37 |
| | 2.6.8.3 | Sequenzierung mittels Illumina HiSeq2000 | 38 |
| | 2.6.8.4 | Auswertung der Datensätze aus der Illumina- und FLX 454-Sequenzierung | 39 |
| 2.7 | Methoden zu | ır Enzymaktivitätsbestimmungen | 39 |
| | 2.7.1 Cellu bank. | lolytische Aktivität der Mikroalgen-Bakterien-Metagenom- | 39 |
| | 2.7.2 Hydro Bakte | olytische und lipolytische Aktivität der Mikroalgen- erien-Metagenombank | 40 |
| | 2.7.2.1 | Plattentest mit Tributyrin (TBT) | 40 |
| | 2.7.2.2 | para-Nitrophenylester (pNP) - Test | 41 |
| | 2.7.3 Identi bierer | ifizierung funktioneller Gene mit potentieller biofilminhi- nder Wirkung aus Metagenombanken | 42 |
| | 2.7.3.1 | Pseudomonas aeruginosa PAO1-Überschichtungsassay | 42 |
| | 2.7.3.2 | Biofilminhibierungsassay im Mikrotitermaßstab - Zellauf- schluss und Gewinnung von Zellrohextrakten | 42 |

| 2.8 | Biochemische- und chemisch-analytische Methoden | 43 |
|-----|--|----|
| | 2.8.1 Bestimmung von Proteinen | 43 |
| | 2.8.2 Bestimmung von Kohlenhydraten | 44 |
| | 2.8.3 Bestimmung von Uronsäuren | 45 |
| | 2.8.4 Bestimmung des Gesamt-Lipidgehaltes | 45 |
| 2.9 | Softwareprogramme und Datenbanken | 46 |
| | 2.9.1 Softwareprogramme | 46 |
| | 2.9.2 Datenbanken | 46 |
| 3 | Ergebnisse | 47 |
| 3.1 | Mikrobiologische und chemische Analysen des Mikroalgen und Bak- | |
| | terien Konsortiums | 47 |
| | 3.1.1 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) | 48 |
| | 3.1.2 Rasterelektronenmikroskopie (REM) | 49 |
| | 3.1.3 Analyse der extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) | 51 |
| 3.2 | Populationsstruktur der Algen-assoziierten bakteriellen Gemeinschaft | 52 |
| | 3.2.1 Phylogenetische Einordnung des bakteriellen Konsortiums | 52 |
| | 3.2.2 Kultivierung und Isolierung von Mikroorganismen aus dem PBR | 58 |
| 3.3 | Analyse des bakteriellen Metagenoms des Mikroalgen-Bakterien-Konsor- | |
| | tiums der Photobioreaktoren | 60 |
| | 3.3.1 Phylogenetische Einordnung der rRNA - Sequenzen | 61 |
| | 3.3.2 Analyse des metabolischen Potenzials der Mikroorganismen | 63 |
| 3.4 | Funktions-basierte Analysen des Mikroalgen-Bakterien-Konsortiums der | |
| | Photobioreaktoren | 68 |
| | 3.4.1 Abbau und Verwertung von Mikroalgenexsudaten | 68 |
| | 3.4.2 Nachweis von B-Vitaminen | 74 |
| 3.5 | Strategien zur Inhibierung von mikrobiellen Biofilmen | 75 |
| | 3.5.1 <i>Pseudomanas aeruginosa</i> PA01-Überschichtungsassay | 76 |

| | 3.5.2 Biofilminhibierungsassay im Mikrotitermaßstab | 77 | |
|-----|--|-----|--|
| | 3.5.3 Sequenzanalyse der Fosmide mit putativ biofilminhibierenden | | |
| | Genprodukten aus der Elbsediment-Metagenombank von Teufels- | | |
| | brück | 78 | |
| 4 | Diskussion | 81 | |
| 4.1 | Mikrobiologische und chemische Analysen des Mikroalgen und Bak- | | |
| | terien Biofilms | 81 | |
| 4.2 | Populationsstruktur der Algen-assoziierten bakteriellen Gemeinschaft | 84 | |
| 4.3 | Kultivierung von Mikroorganismen aus dem PBR | | |
| 4.4 | Metabolisches Potenzial der bakteriellen Population | | |
| 4.5 | Biosynthese von B-Vitaminen | | |
| 4.6 | Metabolisches Potenzial zur Biofilmbildung | 90 | |
| 4.7 | Strategien zur Inhibierung von mikrobiellen Biofilmen | | |
| 4.8 | Schlussfolgerungen und Perspektiven | 94 | |
| 5 | Literaturverzeichnis | 95 | |
| 6 | Anhang | 114 | |

Abbildungsverzeichnis

| Abbildung 2.1: | A: Plattenphotobioreaktoren der Pilotanlage in Hamurg- Reitbrook montiert auf einem Solar-Tracker. | | |
|-----------------|---|----|--|
| | B: Fließdiagramm der Mikroalgen Pilotanlage in Hamburg- Reitbrook | 17 | |
| Abbildung 2.2: | Prinzip zur Herstellung einer Fosmid-Metagenombank mit dem "Copy Control TM Fosmid Library Production Kit" | 36 | |
| Abbildung 2.3: | Struktur Carboxymethylcellulose (CMC) | | |
| Abbildung 2.4: | Hydrolyse eines Lipides mit Hilfe einer Lipase als Katalysator | 40 | |
| Abbildung 3.1: | Biofilmentwicklung in dem Plattenphotobioreaktor | 47 | |
| Abbildung 3.2: | Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen | 48 | |
| Abbildung 3.3: | Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Algen- Bakterien-Kultur | 49 | |
| Abbildung 3.4: | Gehalt an Biopolymeren der extrazellulären polymeren Sub- stanzen aus der Biofilmenprobe (T5) | 52 | |
| Abbildung 3.5: | Rarefaction-Kurve | 53 | |
| Abbildung 3.6: | Phylogenetische Zuordnung der 16S rRNA Insert-Sequenzen aus der Klonbibliothek des PBR-Biofilms (T5) | 55 | |
| Abbildung 3.7: | DGGE-Profil der amplifizierten 16S rRNA-Genfragmente | 55 | |
| Abbildung 3.8: | Phylogenetische Zuordnung der 16S rRNA Gensequenzen aus der RFLP Analyse der Proben T0 - T5 | 57 | |
| Abbildung 3.9: | Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Isolate A-H nach Negativkontrastierung | 59 | |
| Abbildung 3.10: | Zuordnung der 943 rRNA Gensequenzen aus dem Metagenom der mikrobiellen Gemeinschaft des PBR-Biofilms (T5) | 62 | |
| Abbildung 3.11: | Zuordnung der Gene aus dem Cobalamin Metabolismus | 66 | |
| Abbildung 3.12: | Zuordnung der Gene aus dem Thiamin Metabolismus | 67 | |

| Abbildung 3.13: | Zuordnung der Gene aus dem Biotin Metabolismus | 68 |
|-----------------|---|----|
| Abbildung 3.14: | CMC-Agarplattentest | 69 |
| Abbildung 3.15: | Tributyrin-Plattentest | 71 |
| Abbildung 3.16: | pNP-Test der Zellrohextrakte verschiedener Fosmidklone mit unterschiedlichen p NP-Substraten | 71 |
| Abbildung 3.17: | <i>p</i> NP-Test des zellfreien Kulturüberstandes mit unterschied- lichen <i>p</i> NP-Substraten | 73 |
| Abbildung 3.18: | Gehalt an Cobalamin (ng/ml) | 74 |
| Abbildung 3.19: | Gehalt an Biotin (ng/ml) | 75 |
| Abbildung 3.20: | Überschichtungsassay der Elbsediment-Metagenombank von Teufelsbrück | 76 |
| Abbildung 3.21: | Lupenaufnahme einzelner Wells der 96er-Mikrotierplatten. Biofilmbildung von <i>Staphylococcus epidermidis</i> 1457 | 77 |
| Abbildung 3.22: | Lupenaufnahme einzelner Wells der 96er-Mikrotierplatten. Biofilmbildung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 | 78 |

Tabellenverzeichnis

| Tabelle 1.1: | Übersicht zur Biofilmbildung, Struktur, zu den beteiligten Um- weltbedingungen und Genprodukten | 4 |
|--------------|--|----|
| Tabelle 2.1: | verwendete Bakterienstämme | 11 |
| Tabelle 2.2: | Bakterienstämme für molekulare Arbeitsmethoden | 11 |
| Tabelle 2.3: | Vektoren, die in dieser Arbeit verwendet wurden | 12 |
| Tabelle 2.4: | Primer, die in dieser Arbeit verwendet wurden | 12 |
| Tabelle 2.5: | verwendete Antibiotika und andere Medienzusätze | 16 |
| Tabelle 2.6: | verwendete Gensonden | 21 |
| Tabelle 2.7: | Reaktionsbedingung zur Amplifikation der 16S rRNA-Gene bei Bacteria | 33 |
| Tabelle 2.8: | Reaktionsbedingungen zur Amplifikation der 16S rRNA Insert- DNA aus dem Vektor pDrive | 33 |
| Tabelle 2.9: | para-Nitrophenylester, die in dieser Arbeit verwendet wurden | 42 |
| Tabelle 3.1: | Diversität der bakteriellen 16S rRNA der T5 Biofilmprobe (Rare- faction-Analyse, QIIME 1.4.0) | 54 |
| Tabelle 3.2: | Zuordnung der DGGE-Banden zu den phylogenetischen Gruppen. | 56 |
| Tabelle 3.3: | Isolate aus der mikrobiellen Gemeinschaft des PBR's | 58 |
| Tabelle 3.4: | Übersicht zur Anzahl der Sequenzen und Contigs aus der FLX 454- und Illumina-Sequenzierung | 61 |
| Tabelle 3.5: | Schlüsselfunktionen des bakteriellen Biofilm-Metagenoms | 63 |
| Tabelle 3.6: | Anzahl der Gene und Genprodukte aus dem Algen-Bakterien- Metagenom, welche in Zusammenhang zur Biofilmbildung stehen | 64 |
| Tabelle 3.7: | Fosmid-Klone mit putativ cellulolytischer Aktivität | 70 |
| Tabelle 3.8: | Fosmid-Klone mit putativ hydrolytischer / lipolytischer Aktivität | 72 |
| Tabelle 3.9: | Übersicht zur Gesamtsequenzierung der Insert-DNA der putativ biofilminhibierenden Genprodukte der Fosmide aus der Elb- sediment Metagenombank von Teufelsbrück | 70 |
| | seument-ivietagenomoank von Teuteisbruck | 19 |

Abkürzungsverzeichnis

| Abb. | Abbildung |
|------------------|---|
| Amp ^R | Ampicillin-Resistenz |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| bidest. | bidestilliert |
| bp | Basenpaare |
| bzw. | beziehungsweise |
| °C | Grad Celsius |
| ca. | circa |
| Chlamp. | Chloramphenicol |
| CMC | Carboxymethylcellulose |
| Chl ^R | Chloramphenicol-Resistenz |
| dest. | destilliert |
| DMF | Dimethylformamid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Deoxynukleosidtriphosphat |
| d. h. | daher |
| E | Extinktion |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| <i>et</i> al. | und andere |
| EtOH | Ethanol |
| FISH | Fluoreszenz in situ Hybridisierung |
| g | Gramm |
| х g | Vielfaches der Erdbeschleunigung |
| h | Stunde |
| HEPES | 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure |
| IPTG | Isopropyl-b-D-thiogalactopyranosid |
| k | kilo (10 ³) |

| Kan ^R | Kanamycin-Resistenz |
|----------------------------|--|
| kb | Kilobasen |
| 1 | Liter |
| m | milli (10 ⁻³) |
| М | molar (mol/l) |
| MCS | Polylinker (multiple cloning site) |
| mg | milligramm |
| μ | mikro (10 ⁻⁶) |
| μg | mikrogramm |
| μl | mikroliter |
| μm | mikrometer |
| Min. | Minute |
| ml | milliliter |
| mm | millimeter |
| mM | millimolar |
| n | nano (10 ⁻⁹) |
| n.b. | nicht bestimmt |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| nm | Nanometer |
| nt | Nukleotide |
| OD | optische Dichte |
| PB | Phosphatpuffer |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction) |
| pH | negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-konzentration $(\mathrm{H_3O}^{+})$ |
| pNP | para-Nitrophenylester |
| REM | Rasterelektronenmikroskopie |
| Ressource / Accession- Nr. | Datenbank-Zugangsnummer (NCBI) (accession) |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |

| rpm | Umdrehungen pro Minute (rounds per minute) |
|---------------------|--|
| RT | Raumtemperatur |
| S | Svedberg-Einheit |
| SDS | Natiumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate) |
| Sek. | Sekunde |
| sp. | Spezies |
| T _{anneal} | Annealing-Temperatur |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| Taq | Bezeichnung der DNA-Polymerase aus Thermus aquaticus |
| TBT | Tributyrin, Glycerintributyrat |
| TE | Tris-HCl-EDTA |
| T _m | Schmelz-Temperatur (melting temperature) |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| U | Enzymeinheit (unit) |
| u. a. | unter anderem |
| üN | über Nacht |
| V | Volt |
| Vol. | Volumen |
| v/v | Volumen/Volumen (volume per volume) |
| w/v | Gewicht/Volumen (weight per volume) |
| X-Gal | 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-b-D-galactopyranosid |
| z. B. | zum Beispiel |
| z. T. | zum Teil |

spezifische und unspezifische Nukleinbasen

| A | Adenin |
|---|---------------------------------|
| G | Guanin |
| Т | Thymin |
| С | Cytosin |
| Y | Thymin oder Cytosin |
| K | Guanin oder Thymin |
| S | Guanin oder Cytosin |
| Н | Adenin oder Thymin oder Cytosin |

1 Einleitung

Die Minimierung anthropogener CO_2 -Emissionen ist eines der vorrangigsten Ziele unserer Zeit. Neuartige und alternative Technologien zur Deckung des Energiebedarfes bieten die Möglichkeit die globale CO_2 Konzentration zu reduzieren. Beispiele wie die Nutzung von Solarenergie (thermisch oder photovoltaisch), Wasserkraft, Erdwärme, Wind, Biokraftstoffen und Kohlenstoffbindung werden bereits in verschiedenen Entwicklungsphasen umgesetzt (Dewulf & van Langenhove, 2006; Mata *et al.*, 2010). Vor dem Hintergrund abnehmender fossiler Energieträger wird ebenfalls das Interesse an der Nutzung nachwachsender Rohstoffe relevanter. Ein Aspekt ist hierbei die Verwendung von CO_2 als Rohstoff, um nachhaltige und umweltverträgliche Ressourcenkreisläufe zu etablieren. In diesem Zusammenhang werden auch Möglichkeiten der Kultivierung von Mikroalgen in Photobioreaktoren (PBR) untersucht.

1.1 Industrielle Nutzung von Mikroalgen

Der Begriff Mikroalge umfasst im Allgemeinen eine phylogenetisch sehr heterogene Gruppe von pro- und eukaryotischen Mikroorganismen (Richmond, 2008). Sie alle verwenden die oxygene Photosynthese, um atmosphärisches CO₂ in Biomasse umzusetzen (Andersen, 2004; Falkowski *et al.*, 2004; Falkowski & Raven, 2007; Chinnasamy *et al.*, 2009; Velasquez-Orta *et al.*, 2009). Die dabei gebildeten Wert- und Wirkstoffe der Algen können für eine breite Anwendung nutzbar gemacht werden.

So verfügen einige Mikroalgen (z. B. Spirulina-, Chlorella- und Scenedesmus-Arten) über einen hohen Proteingehalt, sodass sie als Eiweißlieferant genutzt werden. Aufgrund des hohen Anteils an essentiellen Aminosäuren werden sie in der Lebensmittelchemie zum direkten Verzehr, als auch als Futtermittel eingesetzt (Kay, 1991; Dillon & Phan, 1993). Pigmente aus Mikroalgen (z. B. Phycobiline und Carotinoide) finden als Farbstoffe Verwendung (Cohen, 1986). Carotinoide dienen außerdem als Futtermittelzusatz bei Tieren (Gouveia *et* al., 1996; 1997). Industriell genutzt werden insbesondere Vertreter der Arten *Dunaliella*, welche zur Gewinnung von β -Carotin herangezogen werden. Durch die antioxidativen Eigenschaften stellen diese einen pharmazeutisch und medizinisch wichtigen Inhaltsstoff der Mikroalgen dar (Borowitzka, 1992). Weiterhin finden vor allem die synthetisierten Polysaccharide und Exopolysaccharide verschiedener Mikroalgen Anwendung als Gelier- und Dispergiermittel (Fischer *et* al., 1997; Jander, 2001). Daneben werden Fettsäuren, Phospholipide und Glycolipide von einigen Mikroalgen in hoher Konzentration synthetisiert. Die ungesättigten Fettsäuren sind hierbei im pharmazeutischen und medizinischen Bereich relevant (Borowitzka *et* al., 2013). Weitere Untersuchungen zeigten, dass Mikroalgenkulturen auch für umwelttechnologische Aspekte bedeutsam sind. Die gebildete Biomasse kann zum Beispiel zur Adsorption von Schwermetallen verwendet werden. Dies ermöglicht auch eine Anwendung bei der Reinigung und Aufbereitung von Abwässern (Fehrmann & Pohl, 1993). Produkte aus Mikroalgen sind nicht nur für die Herstellung von Wertstoffen für Lebensmittel, Futtermittel, Kosmetika und Pharmazeutika interessant (Pulz & Gross, 2004). Sie werden auch oft in großem Maßstab bei der Produktion von Biokraftstoffen kultiviert (Chisti, 2007; Ugwu *et* al., 2008; Williams & Laurens, 2010). Mikroalgen produzieren signifikante Mengen an Lipiden, welche die Grundlage der Produktion von Biokraftstoffen sind (Chisti, 2007; Gouveia & Oliveira, 2009; Williams & Laurens, 2010; Abomohra *et* al., 2012).

Die Kultivierung erfolgt dabei in der Regel entweder in geschlossenen Systemen, wie Rohrund Platten-Photobioreaktoren oder in offenen Kultivierungssystemen, wie zum Beispiel natürliche Seen oder künstliche offene Becken (Lee, 2001; Ugwu *et* al., 2008; Lehr & Posten, 2009). Trotz der voranschreitenden Entwicklung in Konstruktion, Design und Materialforschung von neuen Photobioreaktoren, steht die Produktion mit Mikroalgen in künstlichen Lebensräumen vor vielen Herausforderungen (Lehr & Posten, 2009; Scott *et* al., 2010). Studien zeigten, dass es durch die Mikroalgenkulturen zur Biofilmbildung auf jedem Untergrund kommt, wenn biotische und/oder abiotische Faktoren dies begünstigen (Evans, 2004). Als Folge kommt es zu einer verminderten Flussrate innerhalb der Reaktoranlagen und einer abnehmenden Lichtausnutzung durch die Algenkultur, welches sich letztlich negativ auf das Algenwachstum und deren Produktivität auswirkt (Carvalho *et* al., 2006).

1.2 Biofilme in industriell genutzten Habitaten

Die Anlagerung von Mikroorganismen an Oberflächen und die Ausbildung von Biofilmen sind in der Natur ubiquitär und zählen zu den bislang ältesten bekannten Daseinsweisen von Leben auf der Erde (Schopf *et* al., 1983; Costerton *et* al., 1987). Bis dato gibt es keine Oberfläche, die nicht von Mikroorganismen besiedelt wird oder - unter entsprechenden Bedingungen - besiedelt werden kann (Donlan, 2002). Die Fähigkeit von Bakterien zur dauerhaften Befestigung an unterschiedlichen Materialien führt einerseits zu Beeinträchtigungen technischer Anlagen (Biofouling, Blockierung von Filtern, Keimanreicherung in Rohrsystemen, Biokorrosion etc.; Flemming, 2002). Auf der anderen Seite finden immobilisierte Mikroorganismen Verwendung in technischen Prozessen der biologischen Abwasserreinigung (Biofilmtechnologie; Gälli, 1987).

Klassische Beispiele, wie die Ausbildung von Biofilmen in aquatischen Medien an Schiffsrümpfen oder auch Reinstwasseranlagen veranschaulichen den kostenintensiven Mehraufwand zur Pflege und Instandsetzung verschiedener industrieller Anlagen (Mittelman, 1998; Christensen, 1999). Der mikrobielle Biofilm bildet hier unter anderem die Voraussetzung für die Besiedlung von höheren Organismen (Algen, Pilzen, etc.). Solche unerwünschten Anheftungen von mikrobiellen Konsortien werden allgemein als "Biofouling" bezeichnet (Dworkin et al., 2006). Biofouling ist signifikant für wasserführende Systeme und resultiert in der Beeinträchtigung von Nutzung, Transport, Lagerung und Aufbereitung der produzierten Stoffe (Videla & Characklis, 1992). Ebenfalls wird die Leistungsfähigkeit von Systemen verringert und die Haltbarkeit von Anlagenbestandteilen verkürzt. In Rohrleitungen können Biofilme die Transportkapazität durch Verringerung des Durchmessers und Erhöhung des Reibungswiderstandes erheblich vermindern oder auch zum vollständigen Verschluss von Rohrleitungen und Schläuchen führen (Flemming, 2002). Die Ausbildung von Biofilmen führt jedoch nicht nur zur Einschränkung der Funktion technischer Anlagen. Mikrobielle Aggregate sind darüber hinaus auch direkt an der Korrosion der von ihnen besiedelten Materialien beteiligt. Die Eigenschaft von Biofilmen, Wasser zu binden sowie diverse Stoffwechselendprodukte (organische und anorganische Säuren, Chelat- und Komplexbildner, Exoenzyme) führen zu Schäden an Kunststoffen, mineralischen Baumaterialien und Metallen (Flemming, 1995; Gu, 2003; Allsopp, 2004).

1.3 Biofilmentwicklung

Generell sind Biofilme durch ihre individuellen Umgebungsbedingungen und angrenzenden Oberflächen gekennzeichnet. Darüber hinaus sind Biofilme durch die Synthese von entsprechenden Genprodukten charakterisiert, welche für die Ausbildung, Entstehung und Architektur der Biofilm-Matrix erforderlich sind (Stoodley *et* al., 2002; Flemming *et* al., 2007; Xavier & Foster, 2007; Karatan & Watnick, 2009; Flemming & Wingender, 2010). Im Allgemeinen erfolgt die mikrobielle Biofilmentwicklung in mehreren Phasen über die Bildung eines einschichtigen Biofilms bis zu einem mehrschichtigem komplexen Aufbau der Biofilmmatrix (Tabelle 1.1).

| Biofilmstruktur | Umweltbedingungen / Genprodukte | Beispiele |
|----------------------------|---------------------------------------|--|
| Einschichtiger | Zellfortsätze / Adhäsine | Flagella, Pili |
| Biofilm | synthetisierte Adhäsine | Polysaccharide |
| | spezifische Adhäsine | Rezeptoren der Zelloberfläche |
| Mehrschichtiger | Signale | mechanische Signale |
| Biofilm | | Nährungs- und Stoffwechsel-Signale (Glukose und Katabolitrepression (cAMP), Indole, Polyamine) |
| | | Anorganischen Moleküle (Eisen, Phosphate) |
| | | Osmolarität |
| | | Wirts-abhängige Signale |
| | | antimikrobielle Substanzen |
| | | Quorum Signale (LuxI / LuxR System, acylierte Homoserinlactone (AHL), LuxP / LuxQ System, Interspezies Autoinducer (AI2), Peptide (AIP)) |
| | Sekundäre Botenstoffe und Proteine | c-di-GMP (GGDEF und EAL Proteine, nachgeschaltete Regionen von c-di-GMP (BcsA, PleD), andere Zielregionen (PilZ Domäne, PelD und riboswitches)) |
| | | Übertragung von Phosphorylgruppen (TCSs) |
| | | Transkriptionsfaktoren |
| Biochemische | | Exopolysaccharide |
| Komponenten dor Biofilm | | Proteine |
| matrix | | DNA |
| | | Lipide |
| | | weitere synthetisierte Komponenten |

Tabelle 1.1: Übersicht zur Biofilmbildung, Struktur, zu den beteiligten Umweltbedingungen und Genprodukten.

Die initiale Anlagerung entspricht einem einschichtigem Biofilm. Sie wird als eine einzige Schicht anhaftender Zellen an Oberflächen definiert. Die Ausbildung dieser Struktur wird begünstigt, wenn Zell-Oberflächen-Wechselwirkungen anstatt Zell-Zell-Wechselwirkungen überwiegen. Bisher sind bei Bakterien vor allem adhäsive Strukturen, wie Flagellen, Pili und spezifische Adhäsine bekannt, die an der Bildung eines einschichtigen Biofilms beteiligt sind (O'Toole & Kolter, 1998; Bodenmiller *et* al., 2004; Entcheva-Dimitrov & Spormann, 2004; Kirov *et* al., 2004; Tsang *et* al., 2006).

Die Architektur von mehrschichtigen Biofilmen wird von vielen Faktoren beeinflusst, einschließlich hydrodynamischen Bedingungen, der Konzentration von Nährstoffen, der bakteriellen Motilität und interzellulärer Kommunikation sowie Exopolysacchariden und Proteinen. Einige Studien deuten darauf hin, dass Flagellen als operative Strukturen in die Oberflächensensorik beweglicher Bakterien involviert sind. Generell reagieren Bakterien allerdings auf Nahrungs- und Stoffwechselsignale ihrer Umgebung. So sind zum Beispiel Glukose und andere Zucker starke Induktoren bei der Bildung einer mehrschichtigen Biofilmmatrix (Dobinsky et al., 2003; Kierek & Watnick, 2003; O'Gara, 2007; Shemesh et al., 2007). Darüber hinaus können Indole bei Gram-negativen Bakterien eine stimulierende Wirkung auf die Bildung von Biofilmen haben (Di Martino et al., 2003; Lee et al., 2007). Ebenso können Polyamine als extrazelluläre und/oder metabolische Signale zur Biofilmbildung fungieren (Matthysse et al., 1996; Christen et al., 2005; Karatan et al., 2005; Patel et al., 2006). Ein weiteres wichtiges Umweltsignal stellt die Konzentration von anorganischen Molekülen dar (Deighton & Borland, 1993; Singh et al., 2002; Banin et al., 2005; Mey et al., 2005; Moelling et al., 2007). Osmolarität regelt ebenfalls die Biofilmbildung bei einer Vielzahl von Bakterienarten (Jubelin et al. 2005; Kapfhammer et al., 2005). Ferner können antimikrobielle Verbindungen die Bildung von Biofilmen induzieren (Hoffman et al., 2005; Tabak et al., 2007). Einige Mikroorganismen reagieren auch auf Wirts-bezogene Moleküle (Begley et al., 2005; Hung et al., 2006). Als weiterer wichtiger Signalweg gilt das Quorum-Sensing, welches es Bakterien erlaubt, ihre Genexpression auf einer Zelldichteabhängigen Weise zu koordinieren (Vuong et al., 2000; Miller & Bassler, 2001; Novick, 2003; Friedman & Kolter, 2004; Miller et al., 2004). Neben den bisher genannten Signalen und Signalmolekühlen spielen auch sekundäre Botenstoffe und Proteine eine wesentliche Rolle bei der Anpassung verschiedener Bakterienarten an ihre Umgebung (Simm et al., 2004; Hickman et al., 2005; An et al., 2006; Kuchma et al., 2007; Lee et al., 2007; Sudarsan et al., 2008). Einer der häufigsten Mechanismen, durch die Prokaryoten auf Umweltinformationen reagieren, ist die Übertragung von Phosphorylresten durch Zweikomponenten-Regulationssysteme (TCSs) (Heeb &Haas, 2001; Beyhan *et* al., 2007; Lapouge *et* al., 2008). Darüber hinaus sind ebenfalls Transkriptionsfaktoren an der Synthese von Matrixkomponenten beteiligt (Haugo & Watnick, 2002; Moorthy & Watnick, 2005; Goller *et* al., 2006).

Mikroorganismen, die einen mehrschichtigen Biofilm formen, synthetisieren eine Vielzahl von Komponenten, welche die Matrix des Biofilms bilden und ihr strukturelle Integrität verleiht. Es wird angenommen, dass die Biofilmmatrix bis zu 97% aus Wasser besteht (Sutherland, 2001). Weitere Bestandteile der Biofilmmatrix sind unterschiedliche Konzentrationen an Polysacchariden, Proteinen, DNA, Tensiden, Lipiden, Glycolipiden sowie Membranvesikeln. Es konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass die Konzentration der einzelnen Bestandteile von den jeweiligen Kultivierungsbedingungen der Mikroorganismen abhängt (Sutherland, 2001; Branda *et* al., 2005; Flemming *et* al., 2007).

Die Architektur und Dispersion von Biofilmen wird von physikalischen Bedingungen, wie die Strömungsgeschwindigkeit des Mediums, hydrodynamische Parametern wie Scherspannung und biologische Faktoren beeinflusst (Purevdorj *et al.*, 2002). Die wichtigsten biologischen Determinanten des Biofilmaufbaus sind Mediumzusammensetzung (insbesondere Nährstoffangebote), die Anwesenheit von Tensiden, verschiedene Arten der bakteriellen Motilität (Flagellen, schwärmen und schwimmen) und Quorum-Sensing-Effekte (Flemming & Wingender, 2010).

1.4 Mikroalgen und Bakterien als Gemeinschaft

Obwohl es bekannt ist, dass Mikroalgen mit suspendierten und anhaftenden Bakterien in ihren natürlichen aquatischen Ökosystemen und in experimentellen Kulturen assoziiert sind (Cole, 1982; Lakaniemi *et* al., 2012, 2012) und die Biofilmbildung einen negativen Effekt auf die Kultivierung und industrielle Nutzung hat, gibt es bis dato nur sehr wenige Studien, welche eine detaillierte phylogenetische Charakterisierung der einzelnen Mikroorganismen aufzeigen (Watanabe *et* al., 2005; Otsuka *et* al., 2008; Ueda *et* al., 2009). Die Interaktion zwischen Mikroalgen und Bakterien reichen hierbei von mutualistisch über kommensalisch bis zu parasitisch (Azam & Long, 2001; Schäfer *et* al., 2002; Brehm *et* al., 2003).

Bakterien in diesen nicht-axenischen Kulturen konnten zu den Phyla der Alpha-, Beta- und Gammaproteobacteria zugeordnet werden. Ferner wurden Bakterien beschrieben, die dem Phylum der Bacteroidetes angehören, sowie bisher nicht kultivierbare Bakterien. Es wurden jedoch keine Vertreter der Spezies Archaea nachgewiesen. Zwei Studien aus jüngster Zeit haben eine Teilcharakterisierung der Algen-assoziierten mikrobiellen Gemeinschaft innerhalb von Photobioreaktoren (Lakaniemi *et* al., 2011; 2012) gezeigt. Die Autoren dieser Studien belegen, dass die Mikroalge *Chlorella vulgaris* vor allem mit Alphaproteobacteria (*Sphinogomonas*) und *Dunaliella tertiolecta* mit Alpha- und Gammaproteobacteria assoziiert sind.

Die Lebensweisen von Bakterien in solchen Phytoplanktonkulturen können autotroph oder heterotroph sein. Die wichtigsten Kohlenstoffquellen für heterotrophe Mikroorganismen sind die organischen Substanzen der Algen (Proteine, Kohlenhydrate, Lipide), welche möglicherweise durch Freisetzung während des Wachstums abgegeben werden oder durch Lyse der Algen ins Medium gelangen. Viele Mikroorganismen sind speziell an eine mutualistische Lebensweise angepasst und profitieren in vielfacher Weise von ihrem auto-, mixo- oder heterotrophen Partner (Larsson & Hagström, 1979; Cole, 1982; Coveney, 1982; Wolter, 1982; Münster & Chróst, 1990). Auf der einen Seite kann es durch die Exsudate der Mikroalgen zu einem Selektionsdruck oder zur Entwicklung von angepassten Bakterien kommen (Janse et al., 2000). Auf der anderen Seite wird die Regeneration von anorganischen Nährsoffen durch die Besiedlung von Bakterien erhöht (Bidle & Azam, 1999; 2001). So nehmen prokaryotische Mikroorganismen zahlreiche Schlüsselfunktionen in unterschiedlichen Stoffkreisläufen ein. Neben der Umsetzung von gelösten organischen Kohlenstoff (Azam & Malfatti, 2007; Kirchman, 2012) sind sie aufgrund ihrer Vielfalt an Stoffwechselleistungen (u. a. Nitrifizierung, Denitrifizierung, Sulfatreduktion) an vielen Nährstoffkreisläufen, wie Stickstoff- und Schwefelkreislauf, entscheidend beteiligt (Madigan et al., 2008; Kirchman, 2012). Auch sind Mikroalgen im Allgemeinen auxotroph für verschiedene Vitamine (Croft et al., 2006). So sind viele Algenkulturen auf die Zugabe von Thiamin, Biotin und Cobalamin angewiesen. Thiamin (Vitamin B1) ist eines der wichtigsten Vitamine im primären Kohlenhydrat- und Aminosäure-Stoffwechsel (Warren et al., 2002; Helliwell et al., 2011; Giovannoni, 2012). Biotin ist ein Cofaktor von Biotin-abhängigen Carboxylase-Reaktionen, darunter die Acetyl-Coenzym A (CoA) Carboxylase, welche für die Fettsäuresynthese erforderlich ist (Streit & Entcheva, 2003; Lin & Cronan, 2011). Cobalamin (Vitamin B12) ist einer der komplexesten Cofaktoren und beteiligt an Umlagerungen von Wasserstoff oder Methylgruppen in pro- und eukaryotischen Zellen. Darüber hinaus ist es an der Reduktion von Ribonukleotid-Triphosphat, zu 2'-Desoxyribonukleotidtriphosphat beteiligt (Roth et al., 1996; Martens et al., 2002). Höhere Eukaryoten (d. h. Tiere, Menschen und Protisten) benötigen B12, können es aber nicht synthetisieren. Während Pflanzen eine B12unabhängige Methioninsynthase besitzen, benötigen Algen Cobalamin für die Funktion der B12-abhängigen Methioninsynthase (Duda et al. 1967; Warren et al., 2002; Croft et al., 2005; Helliwell *et* al., 2011; Giovannoni, 2012). B12 wird von Bakterien und Archaeen unter aeroben und anaeroben Bedingungen synthetisiert (Warren *et* al., 2002). Hierbei sind mehr als 20 verschiedene Schritte für die Biosynthese der Corrinoid Ringstruktur aus Uroporphyrinogen III erforderlich (Roth *et* al. 1996; Martens *et* al., 2002). Entsprechend wäre der zentrale Stoffwechsel von (auxotrophen) Organismen ohne eine exogene Quelle von B-Vitaminen gefährdet, und die Zellen wären nicht in der Lage zu wachsen (Croft *et* al., 2005; Droop, 2007; Tang *et* al., 2010; Wagner-Dobler *et* al., 2010). Obwohl angenommen wird, dass die bakterielle Vitamin-Biosynthese vielleicht der Hauptgrund einer positiven Interaktion zwischen Mikroalgen und Bakterien ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere, bisher nicht bekannte bakterielle Faktoren oder Stoffwechselaktivitäten, einen Effekt auf das Algenwachstum haben (Berge *et* al., 1979; Mouget *et* al., 1995).

1.5 Analyse bakterieller Populationen

Zum besseren Verständnis eines Ökosystems werden u. a. die mikrobielle Diversität und die Struktur der Bakteriengemeinschaften untersucht. Die Kenntnis über abundante Mikroorganismen kann Aufschluss über die dominanten Phyla und den damit verbundenen biochemischen Prozessen und mögliche Nährstoffkreisläufe geben (Cottrell & Kirchman, 2000; Pernthaler & Amann, 2005). Für die Untersuchung und Charakterisierung komplexer Bakterienpopulationen gibt es eine Vielzahl an Methoden. Die Kultivierung von Bakterien ist ein wichtiger Bestandteil der mikrobiellen Ökologie und der klassischen Mikrobiologie. Jedoch ist die Kultivierbarkeit von natürlich vorkommenden Mikroorganismen im Labor äußerst gering und die Mehrheit der Bacteria und Archaea lässt sich mit mikrobiologischen Standardmethoden nicht kultivieren (Hugenholtz et al., 1998; Kaeberlein et al., 2002). Anreicherungskulturen selektieren in der Regel Organismen mit hohen Wachstumsraten und solche, die an das Medium adaptiert sind (Heuer & Smalla, 1997; Liesack et al., 1997). Diese stellen jedoch mitunter nur einen kleinen Anteil der mikrobiellen Gemeinschaft dar. Derzeit wird nur ca. 1% der mikrobiellen Diversität durch kultivierte Vertreter repräsentiert, während von der Mehrzahl die Physiologie und ökologische Funktion nahezu unbekannt ist (Amann et al., 1995; Bodelier, 2011).

Metagenom - Technologien erweisen sich hierbei als leistungsfähige Werkzeuge für die Analyse komplexer mikrobieller Gemeinschaften. Die direkte Klonierung von Gesamt-DNA bietet die Möglichkeit, das genetische Potential aller Organismen eines Habitats nutzbar zu machen. So konnte das Wissen über mikrobielle Gemeinschaften, mögliche Funktionen von Proteinfamilien, deren ökologische Bedeutung und Anwendungsmöglichkeiten in der Biotechnologie innerhalb der letzten Jahre erweitert werden (Handelsman, 2004; Streit & Schmitz, 2004; Simon & Daniel, 2011). Aktuelle Beispiele aus Metagenomstudien haben einen ersten Einblick in die komplexen Wechselwirkungen von Mikroorganismen mit ihrer Umwelt gegeben (Streit & Schmitz, 2004; Simon & Daniel, 2009; Lewin *et* al., 2012; Tremaroli & Backhed, 2012; Weinstock, 2012). Überraschenderweise sind nur sehr wenige Studien auf Metagenomanalysen von Algen und deren mikrobiellen Konsortien (Burke *et* al., 2011; Williams *et* al., 2013) fokussiert; darüber hinaus ist bis dato keine Studie bekannt, welche aquatischen Mikroalgen und deren bakteriellen Gemeinschaften in Photobioreaktoren zum Thema hat.

allerdings derzeitige mikrobielle Produktionssystemen Wie zeigen, sind weitere Optimierungen für einen dauerhaften wirtschaftlichen Erfolg eine unverzichtbare Voraussetzung. Weiterführende Studien auf den Gebieten der mikround molekularbiologischen Grundlagenforschung sind demzufolge erforderlich, um eine kontinuierliche Entwicklung der Algenbiotechnologie zu gewährleisten.

1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, Prinzipien zur Interaktion zwischen Mikroalgen und bakteriellen Populationen auf mikrobiologischer und molekularbiologischer Ebene zu analysieren.

Zum einen soll durch mikroskopische Analysen sowie mittels vergleichender Sequenzanalysen der 16S rRNA-Gene ein erster Einblick in die Diversität des bakteriellen Konsortiums gewonnen werden. Darüber hinaus sollen Untersuchungen zum chemischen und biochemischen Aufbau der extrazellulären polymeren Substanzen der Biofilme innerhalb der Photobioreaktoren, Ansatzpunkte zu dessen Vermeidung liefern.

Ein Schwerpunkt soll auf der Analyse des bakteriellen Metagenoms der Mikroalgenkultur liegen. Hierzu gehört die Software-basierte Auswertung der generierten Sequenzdaten der Gesamt-DNA und die Konstruktion einer Fosmid-Metagenombank. Durch die Klonierung und Transformation von DNA-Fragmenten kann das gesamte genetische Potential der Mikroorganismen eines Habitats zugänglich gemacht werden. Metagenomanalysen ermöglichen hierbei nicht nur eine phylogenetische Einordnung der verschiedenen bakteriellen Spezies sondern auch die Analyse von Stoffwechselwegen. Das Hauptproblem bei Metagom-basierten Analysen liegt in der Gewinnung von sauberer und hoch konzentrierter DNA aus den Standortproben (Streit & Schmitz, 2004). Ein Ziel war daher die Isolierung der Gesamt-DNA aus den Mikroalgen-Biofilmproben mit geeigneter Integrität.

Analog zu den kultivierungsunabhängigen Analysen der bakteriellen Populationen sollen phylogenetische und ökophysiologische Untersuchungen an einer *Scenedesmus obliquus*-Kultur durchgeführt werden. Hierbei soll ein besonderes Augenmerk auf die Isolierung verschiedener Bakterien gelegt werden. Die Zusammenhänge zwischen Populationsstruktur und Biotopeigenschaften sollen durch die enzymatische Verwertung der Exsudate der Algen sowie die Synthese kultivierungsrelevanter Verbindungen (Vitamine) durch die Bakterien aufgezeigt werden.

Unter dem Gesichtspunkt, dass die Biofilmbildung in den Photobioreaktoren die Produktivität und das Wachstum der Mikroalgenkultur beeinträchtigen, soll ein weiterer Teilaspekt dieser Arbeit in der Nutzbarmachung biofilminhibierender und -abbauender Strategien liegen. Hierzu sollen funktionelle Untersuchungsmethoden genutzt werden, um Genabschnitte von Fosmiden aus Metagenombanken zu ermitteln (Krohn, 2010), welche eine inhibierende Wirkung auf die Biofilmbildung von Gram-positiven wie auch auf Gram- negativen Bakterien zeigen.

Die verwendeten molekularbiologischen und mikrobiologischen Methoden sollen einen Beitrag zum besseren Verständnis der Interaktion zwischen Mikroalgen und Bakterien leisten, um neue Möglichkeiten für die Forschung und Vermarktung von Mikroalgen und deren mikrobiellen Konsortien zu erschließen.

2 Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme, Vektoren und Primer

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende in den Tabellen 2.1, 2.2, 2.3 und 2.4 aufgeführten Bakterienstämme, Vektoren und Primer verwendet.

| Tabelle 2.1: verwendete E | Bakterienstämme |
|---------------------------|-----------------|
|---------------------------|-----------------|

| Art | Stamm | Herkunft | Verwendung |
|--|--------------|--|---|
| Pseudomonas aeruginosa | PAO1 | Stammsammlung Universität HH, AG Streit | Überschichtungsassay, Biofilminhibierungsassay |
| Staphylococcus epidermidis | 1457 | Stammsammlung UKE, AG Rohde | Biofilminhibierungsassay |
| Lactobacillus plantarum | ATCC 8014 | DSMZ, Braunschweig, Deutschland | Nachweis von Biotin |
| Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis | DSM 20335 | DSMZ, Braunschweig, Deutschland | Nachweis von Cobalamin |

Im Zuge dieser Arbeit isolierte Bakterienstämme sind in Tabelle 3.3 aufgeführt.

| Bakterienstamm | Charakteristika | Bezugsquelle |
|---------------------------------------|---|--|
| E. coli DH5a | lacZM15, lacDZYA-argF, U169, recA1, endA1, hsdR17 (rk ⁻ , mk ⁺), phoA, supE44, thi-1, gyrA96, relA1 | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland (Hanahan, 1983) |
| <i>E. coli</i> Top10 DH10B | F-endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL ΔlacX74 Φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr- hsdRMS-mcrBC) λ- | Stammsammlung Universität Hamburg, AG Streit |
| EPI300 TM -T1 ^R | F ⁻ mcrAD(<i>mrr-hsd</i> RMS- <i>mcr</i> BC) f80d <i>lac</i> ZDM15 D <i>lac</i> X74 recA1 endA1araD139D(ara, leu)7697 galU galK 1- rpsL nupG trfA tonA dhfr | Epicentre, Madison, Wisconsin, USA |

| Vektor | Charakteristika | Größe | Bezugsquelle |
|-----------------------|---|---------|---------------------------------------|
| pDrive | PCR-Klonierungsvektor, <i>oriEc</i> , P _{lac} lacZ, Amp ^R , Kan ^R | 3,85kb | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| pCC1FOS TM | Fosmid-Klonierungsvektor, Chl ^R , cos, lacZ | 8,139kb | Epicentre, Madison, Wisconsin, USA |

Tabelle 2.3: Vektoren, die in dieser Arbeit verwendet wurden

Tabelle 2.4: Primer, die in dieser Arbeit verwendet wurden

| Primer | Sequenz 5' → 3' | Zielregion/ Verwendung | Bezugsquelle/ Referenz |
|--------------|--|--|---|
| 27F 1492R | -AGAGTTTGATYMTGGCTCAG- -CGGYTACCTTGTTACGAC- | Amplifikation der 16S rRNA-Gene von Prokaryoten (1520 bp) | Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland (Brosius <i>et</i> al. 1981; |
| 341F GC | -GCACGGGGGGGCCTACGGGA | Amplifikation der | Lane, 1991) Eurofins MWG |
| 5 m_60 | GGCAGCAG- | 16S rRNA-Gene | Operon, Ebersberg, |
| 907R | -CCGTCAATTCCTTTRAGTTT- | von Prokaryoten (DGGE, 566 bp) | Deutschland (Muyzer & Smalla, 1998) |
| 21F | -TTCCGGTTGATCCYGCCGGA- | Amplifikation der | Eurofins MWG |
| 958R | -YCCGGCGTTGAMTCCAATT- | 16S rRNA-Gene von Archaeen (937 bp) | Operon, Ebersberg, Deutschland (DeLong, 1992) |
| 915F | -GTGCTCCCCCGCCAATTCCT- | Amplifikation der | Eurofins MWG |
| 519R_GC | -CAGCCGCCGCGGTAA- | 16S rRNA-Gene von Archaeen (DGGE, 396 bp) | Operon, Ebersberg, Deutschland (Coolen <i>et</i> al., 2004) |
| M13-20 | -GTAAAACGACGGCCAGT- | Vektor, flankieren die MCS im | Eurofins MWG |
| M13-rev | -CAGGAAACAGCTATGACC- | pDrive | Deutschland |
| pcc1FOS_R | -CTCGTATGTTGTGTGGAATT GTGAGC- | Bindestelle im pcc1FOS | Epicentre, Madison, Wisconsin, USA |

2.2 Chemikalien

Die Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (München), Roth (Karlsruhe) und Serva Feinbiochemica (Heidelberg) bezogen. Sie waren vom Reinheitsgrad "zur Analyse".

2.3 Nährmedien und Zusätze

Die folgenden Medien wurden vor ihrer Verwendung bei einer Temperatur von 121 °C 20 Min. autoklaviert. Antibiotika und hitzeempfindliche Zusätze wurden sterilfiltriert und nach Abkühlung des Mediums auf eine Temperatur von 55-60 °C zugegeben.

2.3.1 "Flory-Medium" zur Kultivierung der Mikroalgen *Scenedesmus obliquus* und *Chlorella vulgaris*

"Flory – Medium"

Dieses Medium wurde zur Kultivierung der Mikroalgen in den Photobioreaktoren sowie im laborinternen Testreaktor verwendet.

| "Flory Basic Fertilizer 1" (Euflor, München) | 2 g |
|--|------------|
| Kaliumnitrat [KNO ₃] | 3,22 g |
| H ₂ O _{dest.} | ad 1000 ml |

2.3.2 Medium zur Anreicherung und Isolierung von Mikroorganismen aus der Mikroalgen-Bakterien Kultur

Für die Isolierung von Bakterien aus der Mikroalgenkultur wurden verschiedene Medien verwendet. Die Kultivierung erfolgte unter aeroben und anaeroben Bedingungen bei 22 °C über einen Zeitraum von 5-7 Tagen. Als Zusatz wurde jeweils direkt Algenkultur hinzugegeben (5-50%, v/v).

NB (Nutrient Broth) – Medium

| Pepton | 5,0 g |
|-----------------------------------|------------|
| Fleischextrakt | 3,0 g |
| H ₂ O _{dest.} | ad 1000 ml |

R2A (Reasoner's 2A) – Medium

| Proteose Pepton (Difco no. 3) | 0,50 g |
|--|------------|
| Hefeextrakt | 0,50 g |
| Casaminosäuren | 0,50 g |
| Glucose | 0,50 g |
| lösliche Stärke | 0,50 g |
| Na-Pyruvat (Brenztraubensäure) | 0,30 g |
| Dikaliumhydrogenphosphat [K ₂ HPO ₄] | 0,30 g |
| Magnesiumsulfat-Heptahydrat [MgSO ₄ x 7 H ₂ O] | 0,05 g |
| H ₂ O _{dest.} | ad 1000 ml |

2 x TY (Tryptone Yeast) – Medium

| Bacteriotrypton | 16 g |
|-----------------------------------|------------|
| Hefeextrakt | 10 g |
| Natriumchlorid [NaCl] | 5 g |
| H ₂ O _{dest.} | ad 1000 ml |

Die pH Werte wurden auf 7,0 - 7,2 eingestellt.

2.3.3 Vollmedium

LB (Luria Broth) – Medium

Dieses Medium wurde zur Anzucht von *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 verwendet.

| Bacteriotrypton | 10 g |
|-----------------------------------|------------|
| Hefeextrakt | 5 g |
| Natriumchlorid [NaCl] | 5 g |
| H ₂ O _{dest.} | ad 1000 ml |

TSB (Tryptic Soy Broth) – Medium (BD, Madison, USA)

Zur Kultivierung von Staphylococcus epidermidis 1457 wurde TSB-Fertigmedium verwendet.

| TSB | 30 g |
|-----------------------------------|------------|
| H ₂ O _{dest.} | ad 1000 ml |

SOC (Super optimal Broth + Glukose als Katabolit) – Medium

Dieses Medium wurde bei Transformationen von Ligationen in chemisch kompetente *Escherichia coli* -Zellen verwendet.

| Bacteriotrypton | 20 g |
|---------------------------------------|------------|
| Hefeextrakt | 5 g |
| Natriumchlorid [NaCl] | 10 mM |
| Kaliumchlorid [KCl] | 2,5 mM |
| Magnesiumchlorid [MgCl ₂] | 10 mM |
| Magnesiumsulfat [MgSO ₄] | 10 mM |
| Glukose | 20 mM |
| H ₂ O _{dest.} | ad 1000 ml |

CMC (Carboxymethylcellulose) – Medium

Dieses Medium wurde für die Durchmusterung der Algen-Metagenombank nach Klonen mit cellulolytischer Aktivität verwendet.

| Bacteriotrypton | 10 g |
|-----------------------------------|------------|
| Hefeextrakt | 5 g |
| Natriumchlorid [NaCl] | 5 g |
| CMC | 2 g |
| H ₂ O _{dest.} | ad 1000 ml |

TBT (Tributyrin) – Medium

Dieses Medium wurde für die Durchmusterung der Algen-Metagenombank nach Klonen mit lipolytischer Aktivität verwendet.

| Bacteriotrypton | 10 g |
|-----------------------------------|------------|
| Hefeextrakt | 5 g |
| Natriumchlorid [NaCl] | 5 g |
| Tributyrin | 10 ml |
| H ₂ O _{dest.} | ad 1000 ml |

Die pH Werte wurden auf 7,0 - 7,2 eingestellt.

Herstellung von Agarplatten

Zur Kultivierung von Bakterienstämmen auf Agarplatten wurden einem Liter Medium vor dem Autoklavieren 15 g Agar zugegeben. Das noch flüssige Medium wurde nach dem Autoklavieren in sterile Petrischalen gegossen. Die Lagerung erfolgte bis zur Verwendung bei 4 °C.

2.3.4 Antibiotika und andere Medienzusätze

In Tabelle 2.5 sind die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika und andere Medienzusätze, das entsprechende Lösungsmittel, sowie die Endkonzentration im Medium aufgeführt. Die Zugabe der Antibiotika und der anderen Medienzusätze erfolgte nach dem Autoklavieren und Abkühlen der Medien auf etwa 55-60 °C.

| Substanz | Lösungsmittel | Endkonzentration im Medium |
|-----------------|-------------------------------------|----------------------------|
| Ampicillin | H_2O_{bidest} | 100 µg/ml |
| Chloramphenicol | 70% EtOH | 12,5 µg/ml |
| IPTG | H ₂ O _{bidest.} | 100 µg/ml |
| X-Gal | DMF | 50 µg/ml |

Tabelle 2.5: verwendete Antibiotika und andere Medienzusätze

2.4 Photobioreaktoren

Der verwendete Photobioreaktor entsprach einem Polyethylenterephthalat (PET) - Plattenphotobioreaktor, welcher an ein Gas-Blockheizwerk von E.on Hanse angeschlossen war (Morweiser *et al.*, 2010). Die Anlage wird mit Sonnenlicht und Rauchgas aus einem Blockheizkraftwerk als Energie und Kohlenstoffquellen betrieben. Zur Kultivierung wurden die Mikroalgenspezien *Chlorella vulgaris* und *Scendesmus obliquus* herangezogen, welche bereits in anderen Studien für die Massenkultivierung im Außenbereich eingesetzt wurden (Doucha *et* al., 2005; Hulatt & Thomas, 2011; Hindersin *et* al., 2013).

Abbildung 2.1 zeigt den Prototypen (A) und die Funktionsweise (B) eines geschlossenen Systems der Photobioreaktor-Pilotanlage in Hamburg-Reitbrook.



Abbildung 2.1: A: Plattenphotobioreaktoren der Pilotanlage in Hamburg-Reitbrook montiert auf einem Solar-Tracker. B: Fließdiagramm der Mikroalgen Pilotanlage in Hamburg-Reitbrook (Hindersin *et al.*, 2013 modifiziert; mit freundlicher Genehmigung von Springer Science and Business Media [Copyright 2013 Springer -Verlag]). → Strömungsrichtung, Pumpe, - Fließstrecke: Medium, ...Fließstrecke: Druckluft, - Fließstrecke: Rauchgas.

Während der Kultivierung zirkuliert ein Teil des Kulturmediums durch eine externe Schaltung. Die Algenbiomasse wurde kontinuierlich geerntet, sodass die Zelldichte auf einen konstanten Wert gehalten wurde. Die physikalischen Parameter und Kulturbedingungen wurden durch Messungen der Trübung, Temperatur, pH, O₂, NH₄⁺, NO₃⁻, und K⁺ überwacht. (WTW IQ Sensor Net, System 2020 XT, Deutschland). Unterhalb eines eingestellten Wertes wurden die Nährstoffe automatisch hinzugefügt. Die Lichtintensität wurde durch einen LI-Sensor 190 (LI-COR, USA) bestimmt. Ein Wärmetauscher im Kultivierungssystem erlaubte die Temperaturregelung.

2.4.1 Algenkultivierung

Die Algenstämme, die in dieser Arbeit verwendet wurden, waren *Scenedesmus obliquus* (Stamm: U169, Herkunft: Universität Hamburg, AG Hanelt, SVCK) und *Chlorella vulgaris* (Stamm: U126, Herkunft: Universität Hamburg, AG Hanelt, SVCK).

Während dieser Arbeit wurden für die Erforschung der mikrobiellen Diversität und der Analyse der Gesamt-DNA verschiedene Biofilm- und Kulturproben aus den Freiland-Photobioreaktoren bei Hamburg-Reitbrook (Hamburg, 53° 28′ 0″ N und 10° 9′ 0″ E) untersucht. Die Chlorophyta wurden dabei bei 17 °C in einem Flüssigmedium bei einer natürlichen Lichtintensität kultiviert. Das Medium bestand jeweils aus 2 g/l "Flory Basic Fertilizer 1" und KNO₃ (3,22 g/l) als Stickstoffquelle. Der pH-Wert wurde mit 1M NaOH bzw. CO₂ bei 6,7 - 7,0 konstant gehalten.

2.4.2 Probennahme

Die Probennahme zur Diversitätsbestimmung und für das Monitoring der Biofilmentwicklung erfolgte mittels sterilen Wattestäbchen. Die Proben wurden entweder direkt als PCR-Template (KoloniePCR) verwendet oder zur Isolierung der extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eingesetzt. Darüber hinaus wurde aus den Proben die Gesamt-DNA extrahiert, welche für die Sequenzierung via Illumina und FLX 454 sowie für die Konstruktion einer Fosmid-Metagenombank diente.

2.5 Mikrobiologische Arbeitsmethoden

2.5.1 Stammhaltung der Bakterien

2.5.1.1 Anlegen von Glycerin-Stammkulturen

Für Glycerin-Stammkulturen wurden von allen verwendeten Bakterienstämmen und Klonen frische über Nachtkulturen angezogen und anschließend jeweils 500 μl Kultur mit 250 μl 86%igem Glycerin vermischt. Die Lagerung erfolgte bei -70 °C.

2.5.1.2 Anlegen von Agar-Stammplatten

Für alle verwendeten Bakterienstämme wurden Agarplatten angelegt. Hierzu wurde von jedem Stamm aus einer Flüssig- oder Glycerinkultur mit einer ausgeglühten Impföse etwas Bakteriensuspension entnommen und auf einer Agarplatte ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte unter den jeweiligen optimalen Wachstumsbedingungen. Die Platten wurden
2.5.2 Nachweis von B-Vitaminen (Biotin, B7 und Cobalamin, B12)

Die verwendeten Indikatorstämme *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 wurden auf MRS-Medium (De Man *et* al., 1960) unter anaeroben Bedingungen für 24 - 48 h bei 37 °C angezogen.

Sowohl die Analyse zur B12-Konzentration als auch die Untersuchungen zum B7-Gehalt wurden im Mikrotiterplatten-Maßstab durchgeführt. Zunächst wurden 200 μ l des jeweiligen Testmediums und 100 μ l der zu untersuchenden Probe in 96-Well-Mikrotiterplatten pipettiert. Die Zellen der Indikatorstämme wurden zentrifugiert (10 Min. 4.000 x g) und dreimal mit fünf ml steriler 0,85% iger Kochsalzlösung gewaschen. Nach der dritten Wäsche werden die Zellen in fünf ml steriler 0,85% iger Kochsalzlösung resuspendiert und 1:100 verdünnt. Mit fünf μ l dieser Suspension wurde jede Vertiefung der Mikrotiterplatte beimpft. Zur Bestimmung der Vitamingehalte wurde bei jedem Test eine Standardkurve mit Konzentrationen von 0,0 - 1 ng Biotin und 0,0 - 500 ng Cobalamin erstellt. Nach 48 h Inkubation unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C wurden die Konzentrationen durch Bestimmung der Zelldichte bei OD₆₂₀ nm bestimmt.

Die Isolierung von Cobalamin erfolgte nach der Methode von Okada et al. (1983) modifiziert nach Denter & Bisping (1994). Durch diese Methode kann zwischen analogen Formen von Vitamin B12 (inaktiv und aktiv) unterschieden werden. 20 ml Probe wurde mit zehn ml 0,2 M Acetatpuffer (NaAc, pH 4,5), 0,4 ml Kaliumcyanid (KCN, 0,5%) und 40 ml doppelt destilliertem Wasser für 15 Min. mit einem Magnetrührer homogenisiert. Im Anschluss wurden die Proben für 10 Min. auf 121 °C erhitzt, auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 0,6 ml 10% iger meta-Phosphorsäure (m-H₃PO₄) versetzt. Es folgte eine Inkubation in Eiswasser für 30 Min. Nachdem das Volumen mit bidestilliertem Wasser auf 100 ml eingestellt worden war, folgte eine Filtration. Dieses Filtrat wurde in zwei Aliquots von je 10 ml (A und B) aufgeteilt. Extrakt A wurde auf pH 6,0 mit 1 M HCl eingestellt und sterilfiltriert. Diese Lösung enthielt Cyanocobalamin und Nicht-Cobalamin Analoga. Im Extrakt B wurde das physiologisch aktive Cyanocobalamin durch die Erhöhung des pH Wertes auf pH 12 mit 5 M NaOH sowie durch Erhitzen bei 121 °C für 30 Min. zerstört. Danach wurde der pH-Wert ebenfalls auf 6,0 eingestellt, gefolgt von einer Sterilfiltration. Zur Bestimmung des Gehalts an Cobalamin wurde das DifcoTM B12 Testmedium verwendet (Denter & Bisping, 1994).

Um den Biotin-Gehalt der Probe zu bestimmen, wurde der Kulturüberstand zentrifugiert und sterilfiltriert. Für die Analysen wurde das DifcoTM Biotin Assay Medium verwendet (Entcheva *et* al., 2001).

2.5.3 Anzucht von Biofilmen in Mikrotiterplatten

Staphylococcus epidermidis 1457

Staphylococcus epidermidis 1457 wurde zunächst über Nacht in TSB-Medium bei 37 °C schüttelnd angezogen. Hier raus wurde eine 1:100 Verdünnung angeimpft und bis zu einer OD_{578} nm von 0,5 bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Im Anschluss wurden 200 µl der Kultur in 96er Mikrotiterplatten (NUNC, Nunclon Surface F) pipetiert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 48 h.

Pseudomonas aeruginosa PAO1

Zunächst wurden die verwendeten Rundboden-Mikrotiterplatten (Sarstedt) mit 50 μ l Aceton für 10 Sek. vorbehandelt und eine über Nachtkultur in 5 ml LB-Medium bei 37 °C schüttelnd angezogen. Im Anschluss wurden 100 μ l einer 1:200 Verdünnung der Kultur in die vorbereiteten 96er Mikrotiterplatten pipettiert und für 12 - 14 h bei 37 °C inkubiert.

Färben der Biofilme

Die Mikrotiterplatten wurden über einem Becherglas ausgekippt und für ca. 1 h bei 60 °C getrocknet. Anschließend wurden 50 μ l einer 5% Kristallviolett-Lösung (Merck KGaA, Darmstadt; Deutschland) in die Wells gegeben und für ca. 2 Min. inkubiert. Im Anschluss wurden die Mikrotiterplatten vorsichtig mit Wasser gespült (O'Toole, 2011).

2.5.4 Mikroskopische Untersuchungen

2.5.4.1 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine spezielle Anwendung der Lichtmikroskopie. Bei der Fluoreszens *in situ* Hybridisierung werden unter anderem domänen-, klassen- oder gattungsspezifische Gensonden gegen die 16S rRNA von Mikroorganismen verwendet. Diese ermöglichen einen Einblick in die Vielfalt und die Zusammensetzung der bakteriellen Populationen unter anderem in Anreicherungs- oder Umweltproben. Die dabei verwendeten Oligonukleotide sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert (Amann *et* al., 1995).

Fixierung der Zellen

Die Zellen werden zunächst bei 10.000 x g für 10 Min. geerntet. Das Pellet wird anschließend in 0,9% NaCl gewaschen.

Für Gram-positive Bakterien und Archaeen erfolgt die Fixierung in einem 1:1-Gemisch aus PBS (25 - 50 µl) und 96%igem Ethanol (eisgekühlt). Der Ansatz wird bei -20 °C aufbewahrt.

Für die PFA-Fixierung (Gram-negative Bakterien) wird das Zellpellet in einem 3:1-Gemisch aus PBS und PFA resuspendiert und eine Stunde auf Eis inkubiert. Schließlich werden die Zellen ebenfalls in einem 1:1-Gemisch aus PBS und gekühlten 96%igen Ethanol bei -20 °C gelagert.

PBS-Puffer:

| Natriumchlorid [NaCl] | 8,0 g |
|--|-----------|
| Kaliumchlorid [KCl] | 0,2 g |
| Kaliumdihydrogenphosphat [KH ₂ PO ₄] | 0,2 g |
| Dinatriumhydrogenphosphat [Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O] | 1,44 g |
| H ₂ O _{dest.} | ad 100 ml |
| | |

4% Formaldehyd-Lösung (PFA):

| PBS-Puffer (60°C) | 20 ml |
|---------------------------|-------|
| Paraformaldehyd | 1 g |
| Natriumhydroxid [NaOH 1M] | 20 µl |

Die pH-Werte wurden auf 7,5 eingestellt und die Lösungen sterilfiltriert.

Fluoreszenz in situ Hydridisierung

Die in situ Hybridisierung wurde mit den Gensonden EUB 338I und Arch 915 durchgeführt.

Tabelle 2.6: verwendete Gensonden

| Sonde | Sequenz (5´→ 3´) | Zielregion | Bezugsquelle/ Referenz |
|----------|------------------------|----------------------|-----------------------------|
| EUB 338I | -GCTGCCTCCCGTAGGAGT- | bakterielle 16S rRNA | (Amann <i>et</i> al., 1990) |
| Arch 915 | -GTGCTCCCCCGCCAATTCCT- | archeelle 16S rRNA | (Stahl & Aman, 1991) |

Für die Fluoreszenz *in situ* Hydridisierung wurden 3 µl fixierte Probe (PFA- bzw. Ethanol fixiert) auf einen Objektträger mit sechs Reaktionsfeldern aufgetragen und getrocknet. Anschließend erfolgte die stufenweise Entwässerung der Zellen mit ansteigender Ethanolkonzentration (50%, 80%, 96%) für je drei Minuten. Nach erneuter Trocknung des Objektträgers wurden 8 µl Hybridisierungspuffer mit der darin suspendierten Gensonde (1 µl) zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte in einem Hybridisierungsofen (OV2 Min.i Hybridisation Oven, Biometra Biomedizinische Analytic GmbH, Göttingen, Deutschland) in einer feuchten Kammer (50 ml Greinerröhrchen mit Hybridisierungspuffer getränktem Papier) bei 46 °C für zwei Stunden. Danach folgte das Waschen des Objektträgers mit dem Waschpuffer (bei 46 °C vorgewärmt) für 20 Minuten. Schließlich wurde mit Aqua dest. gespült und der Objektträger erneut getrocknet.

Hybridisierungspuffer:

| | Archaeen | Bakterien |
|--|------------|------------|
| Formamidgehalt | 20% | 35% |
| 5 M Natriumchlorid [NaCl] | 720 µl | 720 µl |
| 1 M Tris-HCl [C ₄ H ₁₁ NO ₃ -HCl] (pH: 7,2) | 80 µl | 80 µ1 |
| Formamid [CH ₃ NO] | 800 µl | 1400 µl |
| H ₂ O _{dest.} | ad 4000 µl | ad 4000 µ1 |
| 10% SDS | 4 µl | 4 µl |

Waschpuffer:

| | Archaeen | Bakterien |
|--|-----------|-----------|
| 5 M Natriumchlorid [NaCl] | 4,3 ml | 1,4 ml |
| 1 M Tris [C ₄ H ₁₁ NO ₃] HCl (pH: 7,2) | 2,0 ml | 2,0 ml |
| H ₂ O _{dest.} | ad 100 ml | ad 100 ml |
| 10% SDS | 0,1 ml | 0,1 ml |

DAPI-Färbung

Abschließend wurden die gewaschenen und getrockneten Proben für fünf Min. mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) (10 μ l; 0,01 mg/ml), einem Fluoreszenzfarbstoff zur Markierung von DNA gefärbt und mit Aqua dest. gewaschen. Die Lagerung der Objektträger erfolgte im Dunkeln bei 4 °C.

Zur Betrachtung und Auswertung wurde das Epifluoreszenzmikroskop Axio Imager.Z1 (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen, Deutschland) und die dazugehörige Software (AxioVision©AxioVs40 V 4.7.2.0), Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH, München, Deutschland) genutzt.

2.5.4.2 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die mit einem Rasterelektronenmikroskop erzeugten Aufnahmen sind Abbildungen der Objektoberflächen und ermöglichen so unter anderem eine detaillierte Analyse der Oberflächenstrukturen von Mikroorganismen in einer Probe.

Die Kultur- und Biofilmproben wurden mit 1% Paraformaldehyd und 0,25% (v/v) Glutaraldehyd in Phosphatpuffer (PBS; pH 7,4) für jeweils 20 Minuten fixiert. Die Dehydrierung erfolgte durch eine abgestufte Ethanolreihe (30 - 100%) bei Raumtemperatur sowie einer abschließender Kritischer-Punkt-Trocknung, indem die Proben fünfmal mit CO_2 gespült wurden. Nach diesem Schritt wurden die Proben auf Stubs befestigt und mit Gold oder Kohlenstoff beschichtet. Das verwendete Rasterelektronenmikroskop REM LEO 1525 wurde bei 5 kV betrieben.

1% Paraformaldehyd

| Paraformaldehyd (4% PFA) | 10 ml |
|--------------------------|----------|
| PBS-Puffer | ad 40 ml |

0,25% Glutaraldehyd

| Glutaraldehyd (25%) | 400 µl |
|---------------------|----------|
| PBS-Puffer | ad 40 ml |

2.5.4.3 Negativkontrastierung

In biologischen Strukturen sind Atome vorherrschend, die eine sehr geringe Elektronenstreuung aufweisen. Dieser Kontrast kann durch Hinzufügen von Atomen höherer Ordnungszahl (z. B. Schwermetallsalze) künstlich erhöht werden (Brenner & Horne, 1959).

Analog kann die Negativkontrastierung von bakteriellen Kulturproben direkt auf einem Kupfernetz durchgeführt werden. Hierzu wurde das Kontrastierungsmittel Uranylacetat ($\leq 2 \%$) in einzelnen Tropfen auf Parafilm vorgelegt und 3 µl der Probe auf ein Kupfernetz aufgetragen. Nach ca. 60 - 90 Sek. Einwirkzeit wurde die überschüssige Flüssigkeit mit Filterpapier abgesaugt und das Kupfernetz zur Kontrastierung für wenige Sekunden auf den Tropfen Uranylacetat gegeben. Das überschüssige Kontrastierungsmittel wurde mit Filterpapier vom Netz abgenommen und die Präparate getrocknet. Im Anschluss erfolgte die Untersuchung am Transmissionselektronenmikroskop (Model Leo 906E).

2.5.5 Isolierung von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) des Mikroalgen-Bakterien Biofilms

Die Isolierung der EPS erfolgte nach (Wingender *et* al., 2001). Der Bewuchs wurde von den Photobioreaktoren vorsichtig mit einem Spatel abgeschabt und gewogen sowie anschließend in einem Verhältnis von 1:16 (w/v) in 0,14 M NaCl-Lösung suspendiert und unter Rühren bei Raumtemperatur für 60 Minuten homogenisiert. Die Suspension wurde für 30 Minuten bei 20.000 x g und 10 °C zentrifugiert. Die erhaltenen Überstände wurden mittels Membranfilter (Celluloseacetat, Porengröße 0,20 μ m) zweimal sterilfiltriert. Die Filtrate wurden entweder sofort weiter verarbeitet oder aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.6 Molekulare Arbeitsmethoden

2.6.1 Behandlung von Geräten und Lösungen

Zur Sterilisation und zur Inaktivierung von Nukleasen wurden hitzestabile Geräte und Lösungen bei einer Temperatur von 121 °C 20 Min. autoklaviert. Nicht hitzestabile Geräte wurden mit 70%-igem Ethanol gespült und temperaturempfindliche Lösungen sterilfiltriert.

2.6.2 Bestimmung der DNA-Konzentration und -Reinheit

Die Konzentrationsbestimmung von DNA konnte durch die Abschätzung auf einem Agarosegel über die Auftragung einer Kontroll-DNA einer definierten Konzentration und über photometrische Messung erfolgen. Die photometrische DNA Konzentrationsbestimmung erfolgte mit einem Absorptionseinstrahl-Photometer (SmartSpecTM Plus Spectrophotometer, Bio-Rad, München, Deutschland) und Plastibrand[®] UV Mikroküvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm (Brand GmbH, Wertheim, Deutschland) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm. Die Proben wurden 1:10 mit H₂O_{bidest}. verdünnt und gegen H₂O_{bidest}. als Referenz gemessen.

Zwischen der DNA-Konzentration und der Absorption bei 260 nm besteht ein linearer Zusammenhang. Für doppelsträngige DNA gilt nach Cryer *et* al. (1975):

E_{260} 1,0 = 50 µg DNA pro ml

Die Reinheit der isolierten DNA lässt sich anhand der Absorptionsverhältnisse bei 260/280 nm und 260/230 nm abschätzen. DNA besitzt ein Absorptionsmaximum bei 260 nm und ein Absorptionsminimum bei 230 nm. Proteine absorbieren Licht hingegen im Bereich von 280 nm. Laut Marmur (1961) sollte der Quotient bei 260/280 nm größer als 1,85 und bei 260/230 nm größer als 2,1 sein. Reinheitswerte unter 1,6 deuten auf eine zu starke Verschmutzung hin.

2.6.3 Gelelektrophorese

2.6.3.1 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Molekülen zur Kontrolle ihrer Größe, Konzentration und Integrität erfolgte gelelektrophoretisch mit Agarosegelen in einer mit 1x TAE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer (PowerPac BasicTM, BIO-RAD, Hercules, California). Fragmente der DNA-Isolierung (Größe ca. 40 kb) und aus der Fosmid-Isolierung und deren Verdau mit BamHI (Größe ca. 35 kb - 250 bp) sowie PCR-Produkte (bis zu 2500 bp) wurden auf einem 0,8 % Agarosegel (w/v) aufgetragen, die Auftrennung erfolgt bei 120 V 60 Minuten bzw. bei 80 V für 90 Minuten. Für die Auftrennung der PCR Produkte waren 25 Minuten bei 80 V ausreichend. Ansätze aus der Restriktions-Längenpolymorphismus-Analyse (2.6.6.1) wurden auf einem 2% Agarosegel (w/v) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 80 V für 35 Minuten.

Zur Beladung der Gele wurden die Proben mit 1/10 Vol. 10x Ladepuffer gemischt. Nach der Auftrennung folgte das Anfärben der Gele in einem Wasserbad mit 10 µg/ml Ethidiumbromid

für 15 - 20 Min. und ein kurzes Spülen in einem Wasserbad, um überschüssiges Ethidiumbromid zu entfernen. Die Auswertung und Dokumentation der Agarosegele erfolgte unter UV-Licht in der Gel-Dokumentationsanlage (Molecular Imager Gel DocTM XR System, Bio-Rad, München, Deutschland) und der Software Quantity One 4.5.1. Zum Größenvergleich wurde der Standard 1 kb DNA GeneRulerTM bzw. der Standard 100 bp GeneRulerTM (Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland) verwendet.

TAE (50x)

| Tris- HCl | 2 M |
|-----------|--------|
| EDTA | 100 nM |

Der pH-Wert wurde mit Eisessig auf 8,2 eingestellt.

DNA-Ladepuffer

| Glycerin | 30% |
|----------------------------------|-----------|
| EDTA | 50 mM |
| Bromphenolblau (0,25%) | 0,5 g |
| Xylencyanol (0,25%) | 0,5 g |
| H ₂ O _{dest} | ad 200 ml |

Zur Herstellung des Ladepuffers wurden zunächst Glycerin und EDTA in H₂O_{bidest.} unter Erwärmen gelöst. Anschließend wurden die beiden Farbstoffe zugegeben.

2.6.3.2 Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE)

Die denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE) basiert auf der elektrophoretischen Auftrennung amplifizierter, gleichgroßer Genabschnitte (Coolen *et* al., 2004) in einem denaturierenden Polyacrylamidgel mit einem Formamid/Harnstoff-Gradienten. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Sequenz denaturieren die aufzutrennenden Sequenzabschnitte unterschiedlich schnell. Die entstehenden Sekundärstrukturen bewirken eine unterschiedlich hohe elektrophoretische Mobilität der DNA-Stränge.

Die Harnstoff/Formamid-Konzentration kann je nach Versuchsdurchführung entsprechend dem GC-Gehalt angepasst werden.

Die DGGE wurde im DCodeTM Mutation Detection System (BioRad, Hercules, Californien, USA) durchgeführt. Die verwendeten Glasplatten, die Spacer und der Gelkamm (BioRad, Hercules, Californien, USA) wurden vor Versuchsbeginn mittels 70% igem Ethanol gereinigt. Der Harnstoff/Formamid-Gradient ergab sich aus zwei unterschiedlich konzentrierten Stammlösungen.

Stammlösungen für ein 8% iges Gel:

| Acrylamid [C ₃ H ₅ NO] 40% | 20 ml |
|--|-------|
| 25 x TAE-Puffer | 4 ml |
| H2Odest. | 76 ml |

Stammlösung 1 (Acrylamidlösung mit 0% Harnstoff-Formamid)

Stammlösung 2 (Acrylamidlösung mit 100% Harnstoff-Formamid)

| Harnstoff [CH ₄ N ₂ O] | 42 g |
|--|-----------|
| 25 x TAE-Puffer | 4 ml |
| Acrylamid [C ₃ H ₅ NO] 40% | 20 ml |
| Formamid [CH ₃ NO] | 40 ml |
| H ₂ O _{dest.} | ad 100 ml |

Mit diesen beiden Stammlösungen lassen sich Gele mit unterschiedlichen Formamid/Harnstoff-Gradienten herstellen. Das jeweilige Mischungsverhältnis lässt sich anhand der standardisierten Formel nach Muyzer & Smalla (1998) wie folgt berechnen:

(100 -X) x V / 100 + X x V / 100 = V Stammlösung 1 + V Stammlösung 2 (1:1) =V x %
X = Minimaler bzw. maximaler Wert des Gradienten in Prozent
V = Hälfte des gesamten Gelvolumens

Für diese Arbeit wurde ein 40 - 80% iger Harnstoff/Formamid-Gehalt verwendet.

40% Formamid/Harnstoff-Gehalt

| Stammlösung 1 | 12,6 ml |
|---------------|---------|
| Stammlösung 2 | 8,4 ml |

80% Formamid/Harnstoff-Gehalt

| Stammlösung 1 | 4,2 ml |
|---------------|---------|
| Stammlösung 2 | 16,8 ml |

Das Gesamtvolumen des Trenngels betrug 42 ml. Zur Polymeration wurden 82 μ l APS und 17 μ l TEMED hinzugegeben. Die Ansätze sind mit Hilfe einen Gradientenmischers zu einem linearem Formamid/Harnstoff-Gradienten gegossen worden. Über das Trenngel wurde das Sammelgel mit einem Volumen von 10 ml (Stammlösung 1) gegossen. Auch hier erfolgte die Zugabe von APS (50 μ l) und TEMED (10 μ l) zur Polymerisation. Die Aushärtung des Gels erfolgte über Nacht bei 4 °C.

Der Puffer (1,5 x TAE-Puffer) der DGGE-Kammer wurde zunächst auf 60 °C erhitzt. Nach Erreichen der Temperatur wurde das Gel in die Kammer eingesetzt und ebenfalls aufgewärmt. Anschließend erfolgte das Beladen des Gels mit 30 µl der PCR-Produkte, wobei in die nicht genutzten Taschen dieselbe Menge eines PCR-Reaktionspuffers pipettiert worden ist, sodass eine gleichmäßige Ionenverteilung im gesamten Gel entsteht. Die Elektrophorese erfolgte bei 105 V und 60 °C für 17 Stunden über Nacht. Danach wurde das Gel für etwa 20 Min. in einem Ethidiumbromidbad gefärbt und anschließend kurz in H₂O gespüllt. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte unter UV-Licht in der Gel-Dokumentationsanlage (Molecular Imager Gel DocTM XR System, Bio-Rad, München, Deutschland) und mittels der Software Quantity One 4.5.1.

2.6.4 Isolierung von Nukleinsäuren

2.6.4.1 Isolierung von Gesamt-DNA aus den Reaktorproben

Im Allgemeinen bestehen die Protokolle zur DNA-Isolierung aus Umweltproben aus folgenden Schritten: 1. Lysis der Zellen, 2. Trennung der DNA von anderen Zellbestandteilen wie Polysacchariden und Proteinen, 3. Trennung der DNA von Umweltpartikeln und

Reinigung der DNA von sonstigen Bestandteilen, 4. DNA-Fällung, 5. weitere Reinigungsschritte.

2.6.4.1.1 Yeates *et.* al. 1998, modifiziert

Zur Optimierung der DNA-Konzentration und -Reinheit war eine Modifizierung einer bereits laborinternen Extraktionsmethode erforderlich (Yeates *et* al., 1998; Krohn-Molt *et* al., 2013).

Die verwendeten Proben stammen direkt aus der Kultur der Photobioreaktoren sowie aus den Biofilmen der Photobioreaktorwänden.

Die zu analysierende Probe wurde in 10 ml Extraktionspuffer (100 mM Tris-HCl [pH 8,0], 100 mM Natrium-EDTA [pH 8,0], 1,5 M NaCl, 0,1% TWEEN 80) und nach Zugabe von 5 mg Lysozym und 0,5 mg Proteinase K üN bei 200 U/min gerührt. Im Anschluss wurde SDS (1 ml, 20%) hinzugefügt und 90 Min. bei 65 °C inkubiert. Die Probe wurde in ein 50 ml Zentrifugengefäss überführt und 10 Min. bei RT und 6.000 x g zentrifugiert. Das Pelett wurde in 10 ml Extraktionspuffer resuspendiert, für 10 Min. bei 65 °C inkubiert und erneut zentrifugiert. Die Überstände wurden in einem 50 ml Zentrifugengefäss gesammelt und mit 1 Vol. PEG (Polyethylenglykol 6000 [30%] / NatriumChlorid [1,6 M]) versetzt. Nach zwei stündiger Inkubation bei RT wurde der Ansatz 20 Min. bei 10.000 x g zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 1,5 ml TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM Natrium-EDTA, pH 8,0) resuspendiert. Zur Abtrennung von Proteine und Polysacharide, wurde der Ansatz in ein steriles 2,0 ml Eppendorfgefäß überführt und mit 7,5 M Kaliumacetat versetzt, so dass eine Endkonzentration von 0,75 M vorlag. Nach einer Inkubation für fünf Min. auf Eis, wurden die Proteine und Polysacharide bei 16.000 x g für 30 Min. und 4 °C abzentrifugiert. Die Extraktion der DNA erfolgte durch eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Fällung. Die wässrige Phase wurde zunächst mit 1 Vol. Chloroform/Iso-amlalkohol (24:1) versetzt und nach gründlichem invertieren bei 13.600 x g 15 Min. zentrifugiert. Als zusätzlicher Reinigungsschritt wurde erneut die wässrige Phase mit 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, invertiert und bei 13.600 x g 15 Min. zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde unter Vermeidung der Interphase in ein neues Gefäß überführt und nach Zugabe von 0,7 Vol. Isopropanol, welches mit 1/10 Vol. 3 M NaAcetat versetzt war, üN bei -20 °C präzipitiert. Die DNA wurde am nächsten Tag für 90 Min. bei 4 °C und 16.000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet zweimal mit jeweils 500 µl eiskaltem 70%-igem EtOH gewaschen. Im nachfolgendem Schritt wurde das Pellet getrocknet und letztlich in 100 µl TE aufgenommen. Die DNA wurde üN bei 4 °C gelöst. Abschließend erfolgte die Bestimmung der Reinheit und Konzentration (2.6.2, 2.6.3).

2.6.4.2 Präzipitation von Nukleinsäuren

Zur Erhöhung des Reinheitsgrades, zur Aufkonzentration oder für einen Pufferwechsel wurde in Lösung befindliche DNA gefällt und erneut in Lösung gebracht. Durch die Zugabe von 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat- Lösung (pH 4,8) und 2,5 Vol. absolutem Ethanol wurde die DNA 20 Min. bei -20 °C gefällt und anschließend bei 13.600 x g, 4 °C für 20 Min. pelletiert. Nach einem Waschschritt mit eisgekühltem 70% Ethanol wurde das Pellet getrocknet und in dem erforderlichen Volumen H₂O_{dest.} oder TE-Puffer aufgenommen.

2.6.4.3 Isolierung von Fosmid-DNA

Die Plasmid- oder Fosmidisolierung durch alkalische Lyse dient der Trennung von Plasmidbzw. Fosmid-DNA von genomischer DNA.

Als Ausgangsmaterial dienten je 5 ml einer induzierten Epi300-Kultur der verwendeten Metagenombanken (2.6.7.2). Die Zellen wurden bei 13.600 x g (minispin Plus, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) für 60 Sek. geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 100 µl RNase-haltigem P1-Puffer resuspendiert. Zur Lyse der Bakterienzellen wurden 200 µl P2-Puffer zugegeben und der Reaktionsansatz invertiert. Nach zwei bis fünf minütiger Inkubation war die Lösung klar. Zur Neutralisierung folgte die Zugabe von 150 µl P3-Puffer. Der Ansatz wurde invertiert. Um die beiden Phasen zu trennen, wurde der Reaktionsansatz 5 Min. bei 13.600 x g zentrifugiert. Der erhaltene Überstand von ca. 400 µl wurde in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml eiskaltem Ethanol (absolut) überschichtet, um die DNA zu präzipitieren. Der Reaktionsansatz wurde für 30 Min. bei -20 °C inkubiert und anschließend 20 Min. bei 13.600 x g und 4 °C zentrifugiert (Centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet zweimal, mit jeweils 1 ml eiskaltem 70%-igem EtOH, gewaschen. Zuletzt wurde das DNA-Pellet getrocknet und letztlich in 30 µl H₂O_{bidest}. üN bei 4 °C gelöst.

P1- Puffer

| Tris- HCl [C ₄ H ₁₁ NO ₃ -HCl] | 50 mM |
|---|-----------|
| EDTA [C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈] | 10 mM |
| RNase A | 1 mg/ml |
| H ₂ O _{bidest.} | ad 100 ml |

Der pH-Wert wurde auf 8,0 eingestellt.

P2- Puffer

| Natriumhydroxid [NaOH] | 200 mM |
|--|-----------|
| SDS [C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S] | 1% (w/v) |
| H ₂ O _{bidest} | ad 200 ml |

P3- Puffer

| Kaliumacetat [C ₂ H ₃ KO ₂] | 3 M |
|---|-----------|
| H ₂ O _{bidest.} | ad 200 ml |

Der pH-Wert wurde mit Eisessig auf 5,5 eingestellt.

Alle Lösungen wurden sterilfiltriert.

Zur Isolierung von hochreiner Plasmid- und Fosmid- DNA wurde das Easy Prep[®] Pro Plasmid Miniprep Kit (Biozym Biotech Trading GmbH, Wien) verwendet. Das Prinzip beruht auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen, gefolgt von der Adsorption der DNA an eine Silicamembran in Gegenwart einer hohen Salzkonzentration. Alle verwendeten Lösungen und Säulen waren in dem Kit enthalten und wurden gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die DNA wurde in H₂O_{bidest.} eluiert und für Sequenzierungsreaktionen (2.6.8.1) verwendet.

2.6.5 Polymerase - Kettenreaktion (PCR)

Mittels der Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chaine Reaction, PCR) können gezielt einzelne Genombereiche *in vitro* amplifiziert werden (Mullis *et* al., 1986; Mullis & Faloona, 1987). Das Prinzip der PCR beruht auf der zyklischen Wiederholung dreier Reaktionsschritte, die bei definierten Temperaturen stattfinden. In dem ersten Schritt, welcher als Denaturierung bezeichnet wird, wird die Template-DNA auf 94 °C erhitzt um die doppelsträngige DNA in komplementäre Einzelstränge aufzutrennen. In dem zweiten Schritt, dem Primer Annealing, lagern sich synthetische Einzelstrang-Oligonukleotide, die komplementär zu den flankierenden Sequenzen des zu amplifizierenden Genomabschnittes sind, an die separierten DNA-Stränge an. Im dritten Schritt, der sogenannten Elongation, wird durch eine hitzestabile DNA-Polymerase der jeweils komplementäre DNA-Strang in 5'-3'-Richtung synthetisiert.

Die Durchführung der PCR erfolgte in Thermocyclern (Mastercycler personal, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) das dabei verwendete PCR-Programm richtete sich jeweils nach den unterschiedlichen Annealing-Temperaturen der Primer und der Länge des zu amplifizierenden Genabschnittes. Für die *Taq*-Polymerase wurde von einer Elongationsgeschwindigkeit von 1 kb/min ausgegangen. Für die *Pfu*-Polymerase wurde von einer Elongationsgeschwindigkeit von 2 kb/min ausgegangen.

2.6.5.1 Primer

Nachfolgend sind die Formeln zur Berechnung der Schmelztemperatur T_m der Primer (Chester & Marshak, 1993) und die daraus resultierende Anlagerungs- bzw. Annealing-Temperatur T_{ann} dargestellt:

Schmelztemperatur $T_m = 69.3 \text{ °C} + 0.41 \text{ °C} \text{ x } [GC\%] - (650 \text{ / bp-LängePrimer})$

Anlagerungstemperatur $T_{ann} = T_m - 5 \ ^{\circ}C$

Es wurde immer die niedrigere T_m eines Primers im jeweiligen Primer-Paar verwendet. Die Schmelztemperaturen der in dieser Arbeit verwendeten Primer sind der Tabelle 2.4 zu entnehmen.

2.6.5.2 PCR- Ansatz

Standard-PCR-Ansatz

| DNA-Template (ca. 100 ng/µl) | 1,0 µl |
|---|----------|
| <i>Taq</i> -Puffer (mit MgCl ₂) 10x | 2,5 µl |
| dNTPs (2 mM) | 2,0 µl |
| Primer - forward (10 µM) | 1,0 µl |
| Primer - reverse (10 µM) | 1,0 µl |
| <i>Taq</i> -Polymerase (2,5 U/µl) | 0,5 µl |
| H ₂ O _{bidest.} | ad 25 µl |

Der PCR-Ansatz wurde auf Eis zusammenpipettiert.

2.6.5.3 Amplifikation der 16S rRNA-Gensequenzen

Die bakterielle Vielfalt, der mit verschiedenen Mikroalgen azzozierten Mikroorganismen wurde durch Nutzung von PCR-Amplifikationen, Subklonierung in geeignete Vektoren sowie durch die Restirktions-Fragmentlängenpolymorphismus-Analyse bestimmt.

| Reaktionsschritt | Temperatur [°C] | Zeit [Min:Sek] | Anzahl der Zyklen |
|--------------------------|-----------------|----------------|-------------------|
| Initiale Denaturierung | 94 | 3:00 | |
| Denaturierung | 94 | 0:45 | |
| Annealing | 50 | 0:45 | 34 |
| Elongation | 72 | 1:30 | |
| Finale Elongation | 72 | 3:00 | |

Tabelle 2.7: Reaktionsbedingung zur Amplifikation der 16S rRNA-Gene bei Bacteria

Tabelle 2.8: Reaktionsbedingungen zur Amplifikation der 16S rRNA Insert-DNA aus dem

| Reaktionsschritt | Temperatur [°C] | Zeit [Min:Sek] | Anzahl der Zyklen |
|------------------------|-----------------|----------------|-------------------|
| Initiale Denaturierung | 94 | 3:00 | |
| Denaturierung | 94 | 0:45 | |
| Annealing | 57 | 0:45 | 34 |
| Elongation | 72 | 1:45 | |
| Finale Elongation | 72 | 3:00 | |

2.6.5.4 Aufreinigung der PCR-Produkte

Vektor pDrive

Das PCR Clean Up Kit von Avegene ermöglicht es, im Anschluss an eine PCR störende Salze, nicht eingebaute Mononukleotide, Primer und die Polymerase aus den Reaktionsansätzen zu entfernen. Alle verwendeten Lösungen und Säulen waren in dem Kit enthalten und wurden gemäss den Angaben des Herstellers verwendet. Die DNA wurde in $10 - 20 \ \mu l H_2O_{bidest.}$ eluiert und durch Agarosegelelektrophorese überprüft. Die auf gereinigten PCR-Amplifikate wurden in molekularen Arbeitstechniken, wie beispielsweise in Sequenzierungsreaktionen oder Ligationen, weiter verwendet.

2.6.6 Enzymatische DNA-Modifikation

2.6.6.1 Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Für die Spaltung von DNA wurden Restriktionsendonukleasen vom Typ II verwendet, welche an spezifischen, vorwiegend palindromischen Erkennungssequenzen schneiden (Szybalski *et* al., 1991). Die Verwendung der Enzyme erfolgte gemäß den Herstellerangaben (Fermentas, LIFE SCIENCE, St. Leon-Rot, Deutschland).

Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)

Für die Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analysen im Rahmen der phylogenetischen Untersuchungen (3.2.1.) wurden die in den Vektor pDrive ligierten PCR-Produkte der 16S rRNA und anschliessender Transformation erneut mit M13-Primern amplifiziert und mit HpaII restringiert. HpaII (Schnittstelle: 5'-C↓CGG-3') schneidet in einem DNA-Fragment statistisch alle 200 bp, sodass über unterschiedliche Restriktionsmuster die Diversität der Mikroalgen-Bakterien-Kultur ermittelt werden kann.

Qualitätsüberprüfung der Algen-Bakterien-Metagenombank

Das Schneiden der Fosmid-DNA aus der Metagenombank mit dem Restriktionsenzym BamHI (Schnittstelle: 5'-G \downarrow GATCC-3') fand hier analytische Anwendung zur Ermittlung der durchschnittlichen Insertgröße, der in der Metagenombank enthaltenen Klone (2.6.7.2). Das Restriktionsenzym BamHI schneidet zweimal im pCC1FOS CopyControl Vector.

Die Zusammensetzung der jeweiligen Ansätze ergab sich wie folgt.

| DNA (z. B. Fosmide oder PCR-Produkte) | 0,4-1,0 µg |
|---------------------------------------|------------|
| Restriktionsenzym-Puffer (10 x) | 2 µl |
| Restriktionsenzym (10 U/µl) | 0,5 µl |
| H ₂ O _{bidest.} | ad 20 µ1 |

Die Ansätze wurden 2 h oder über Nacht, bei 37 °C, inkubiert. Die Inaktivierung erfolgt bei 65 °C für 20 Min. Die Fragmente wurden auf einem 0,8%-igem bzw. 2%-igem Agarosegel überprüft (2.6.3.1).

2.6.6.2 Ligation von Vektor und Fragment-DNA

Für die Ligation von Vektor- und Fremd-DNA werden geeignete Mengen beider DNA-Molekühle mit dem Ligationsmastermix vermengt.

Besitzen sowohl Vektor-DNA als auch Fremd-DNA komplementäre überstehende Enden, können sich diese durch Basenpaarung aneinander lagern. Für die Ligation wurde das PCR-Cloning-Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) verwendet. Der verwendete Vektor pDrive lag im Kit in linearisierter Form vor und besitzt überhängende Uridin Basen am 5'-Ende des Nukleotidstranges, das PCR-Produkt verfügt über überhängende Adenosinenden am 3'-Ende des Nukleotidstrangs, welche durch die *Taq*-Polymerase angehangen werden. Die beiden

DNA-Stränge werden mit Hilfe der Ligase durch Phosphodiesterbindungen verknüpft. Ein rekombinantes, zirkuläres DNA-Molekül wird gebildet.

Alle verwendeten Komponenten waren im Kit enthalten und wurden wie folgt zusammengegeben.

| Ligationsmastermix der Firma Qiagen | 2,5µl |
|-------------------------------------|-------|
| Auf gereinigtes PCR-Produkt | 2µ1 |
| pDrive-Vektor der Firma Qiagen | 0,5µl |

Die Ligation erfolgt für 2 h bei 16 °C und anschließend, wie in 2.6.6.2 beschrieben, in die Transformation eingesetzt.

2.6.7 Transformationsverfahren

2.6.7.1 Transformation von chemisch kompetenten Escherichia coli-Zellen

Kompetente *E. coli* DH5α und *E. coli* TOP10DH10B-Zellen wurden von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt und bei -70 °C gelagert.

2.6.7.2 Hitzeschock-Transformation

Zur Hitzeschock-Transformation wurden die chemisch kompetenten Zellen zunächst 5 - 10 Min. auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 10 µl von der zu transformierenden DNA (Ligationsansatz) zugegeben. Der Ansatz wurde mit der Pipettenspitze vorsichtig gemischt und 30 Min. auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte über einen Zeitraum von 90 Sek. bei 42 °C. Die Zellen wurden im Anschluss für fünf Min. auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 800 µl flüssigem LB/Ampicillin- oder SOC- Medium wurde der Ansatz für 45 Min. bei 37 °C geschüttelt. Die Zellen wurden auf LB/Ampicillin/IPTG/X-Gal-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.6.7.3 Selektion der Klone

Zunächst erfolgt die Selektion aufgrund der Ampicillin-Resistenz des Vektors pDrive. Nur die *E. coli-*Zellen, die bei der Transformation tatsächlich einen Vektor aufgenommen haben, können auf den LB/Ampicillin/IPTG/X-Gal-Platten wachsen. Die Auswahl der Klone mit einem Insert im Vektor stützt sich auf eine Blau-Weiß-Selektion.

Das *lacZ*'Gen im pDrive Plasmid entspricht dem 5'-Bereich des *lacZ*-Gens, das für die Nterminale Region der β -Galactosidase codiert. Das Bakterium *E. coli* liefert den 3'-Bereich, sodass das *lacZ*-Gen funktionell komplimentiert werden kann. X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3indolyl-ß-galactopyranosid) dient als Substrat der β -Galactosidase. Bei dessen Spaltung entsteht 5-Bromo-4-chloroindoxyl, welches durch Sauerstoff zu einem blauen Indigofarbstoff (5,5'-Dibromo-4,4'dichloroindigo) oxidiert. Wird in die *lacZ*'-Region, welches die Multiple cloning site beinhaltet, ein fremdes DNA-Stück integriert, wird die Funktion des Gens zerstört und der Farbumschlag kann nicht erfolgen. Bakterienkolonien mit Plasmid ohne Insert und mit intaktem *lacZ*'-Gen färben sich auf einem mit X-Gal (= Substrat der β -Galactosidase) und IPTG (= Induktor der β -Galactosidase) behandelten Nährboden blau. Bakterien mit Plasmid, die DNA-Fragmente enthalten, bleiben weiß.

Zur Selektion auf putative positive Klone wurden die LB/Amp/IPTG/X-Gal-Platten für 2 h bei 4 °C weiter inkubiert, um die Blaufärbung zu verstärken. Der Klonierungserfolg wurde mittels diagnostischer PCR überprüft (verwendete Primer: M13 forward (-20) und M13 reverse). Mit der Pipettenspitze wurde in die jeweiligen Kolonien gestochen und kurz auf die Masterplate getupft und erneut bei 37 °C über Nacht inkubiert. Anschließend erfolgte die Überführung der Bakterien in die vorbereiteten PCR-Reaktionsansätze (2.6.5.2).

2.6.7.4 Transduktion mit dem "Copy Control[™] Fosmid Libary Production Kit"

Um die Gesamtheit der Mikroorganismen des Photobioreaktors zu erfassen und somit das genetische Potential unabhängig von der Kultivierbarkeit der Organismen nutzbar zu machen, wurde die aus der Probe isolierte DNA (2.6.4.1) mit Hilfe des "Copy ControlTM Fosmid Library Production Kit" in Fosmid-Vektoren kloniert. Diese Vektoren wurden *in vitro* in Lambda-Phagen Köpfe verpackt und letztlich in *E. coli*-Stämme transduziert. Die einzelnen Schritte, die erforderlich waren um eine Fosmid-Metagenombank zu konstruieren, wurden entsprechend der Anleitung des Herstellers durchgeführt (Abbildung 2.2).



Abbildung 2.2: Prinzip zur Herstellung einer Fosmid-Metagenombank mit dem "Copy ControlTM Fosmid Library Production Kit" (http://www.epibio.com; Juni 2013).

2.6.8 Sequenzierung

Innerhalb der letzten Jahre hat sich der Bereich der Sequenzierung weitgehend verändert. So können durch neue Technologien dem sog. "Next Generation Sequencing" Sequenzrohdaten im Gigabasenbereich in wenigen Tagen generiert werden. Hierbei stellt die Leselänge den wesentlichen Unterschied zwischen den Technologien für die bioinformatische Analyse dar. Sie variiert z. B. bei den "Short-read-Technologien" von 36 bis ca. 100 bp (z. B. Illumina Genome Analyzer II, Applied Biosystems SOLiD System), über ca. 250 bis maximal 700 bp (z. B. Roche Diagnostics GS FLX) bis zu 1100 Basen der klassischen Sangertechnologien (z. B. Applied Biosystems 3730XL) (Shendure & Ji, 2008; Thomas *et* al., 2012).

2.6.8.1 Sequenzierung von Insert-DNA aus Plasmid-Vektoren

Die Sequenzierung der Insert-DNA zu den phylogenetischen Bestimmungen (DGGE, RFLP und Rarefactionanalyse) erfolgte bei der Firma Seqlab, Sequence Laboratories (Göttingen). Pro Reaktion wurden folgende Komponenten vorgelegt: Template-DNA (PCR-Produkt: 120 ng, Plasmid-DNA: 300-600 ng) sowie ein entsprechender Primer in einer Endkonzentration von 20 pmol/ μ l. Dieser Ansatz wird mit H₂O_{dest.} auf 7 μ l aufgefüllt. Die Sequenzierung erfolgte nach dem Kettenabbruchverfahren nach (Sanger *et* al., 1977); dieses umfasst drei Reaktionsschritte:

Reaktionsgemisch werden Oligonukleotidprimer, DNA-Polymerase, Dem die vier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) sowie eines der vier mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten 2',3'-Didesoxyribonucleosid-5'-triphosphate (ddNTPs) zugesetzt. Zunächst bindet ein Primer an die komplementäre Sequenz des Matrizenstranges (Anlagerung). Ausgehend von dem freien 3'-OH-Ende des angelagerten Primers beginnt die DNA-Polymerase mit der Synthese eines komplementären DNA-Stranges (Elongation). Da beim Einbau der Nukleotide nicht zwischen dNTPs und ddNTPs unterschieden wird, kommt es an beliebigen Positionen zum Einbau der markierten ddNTPs und somit zum Abbruch der Elongation (Termination). Auf diese Weise entstehen unterschiedlich lange DNA-Fragmente, die im Anschluss Größe aufgetrennt werden chromatographisch nach ihrer können. Dank der fluoreszenzmarkierten ddNTPs kann jeweils das letzte eingebaute Nukleotid detektiert und so die Sequenz des DNA-Stranges abgelesen werden.

2.6.8.2 Sequenzierung mittels FLX 454

Die Sequenzierung der Gesamt-DNA aus den Photobioreaktoren und der Insert-DNA aus Fosmid-Vektoren der Metagenombanken erfolgte mittels FLX 454. Hierbei wird die Sequenzierbibliothek durch eine Emulsions-PCR erstellt und die Abfolge der einzelnen Basen mit der sogenannten Pyrosequenzierung ermittelt.

Bei der Emulsions-PCR (emPCR) wird ein einzelnes DNA-Molekül in einer Öl/Wasser-Emulsion amplifiziert und an Trägerkugeln gebunden. Bei der anschließenden Pyrosequenzierung wird in jedem Zyklus nur jeweils ein Nukleotid angeboten. Der Einbau einer Base durch die DNA-Polymerase wird hierbei indirekt detektiert, indem das freigesetzte Pyrophosphat (PPi) über eine enzymatische Reaktion nachgewiesen wird. Das Pyrophosphat wird durch die ATP-Sulfurylase zu Adenosintriphosphat (ATP) umgesetzt, welches wiederum die Reaktion des Enzyms Luziferase mit Luziferin katalysiert. Dabei entsteht neben Oxyluziferin ein Lichtsignal, dessen Stärke proportional zum verbrauchten ATP und damit zur Anzahl der eingebauten Basen ist. Dieses wird mittels einer CCD-Kamera aufgenommen (Shendure & Ji, 2008).

2.6.8.3 Sequenzierung mittels Illumina HiSeq2000

Ergänzend zu den FLX 454 Sequenzdaten, wurde die Gesamt-DNA der Photobiereaktorprobe ebenfalls mittels Illumina sequenziert. Als Ausgangsmaterial diente eine DNA-Probe mit einer Konzentration von 319,7 ng und einem Reinheitsgrad $OD_{260/280}$ von 1,9.

Bei der Illumina HiSeq 2000 Technologie werden die zu sequenzierenden DNA-Fragmente zunächst mit der sogenannten Brücken-PCR (Bridge-PCR) amplifiziert. Die Sequenziertechnologie basiert auf dem Einsatz reversibler Farbstoff-Terminatoren.

Bei der Brücken-PCR werden die DNA-Matrizen und Primer an eine zweidimensionale Oberfläche immobilisiert. Die Primer sind so konzipiert, dass sie an die Adaptoren der DNA-Fragmente hybridisieren. In jedem PCR-Zyklus binden die DNA-Fragmente daher an die Primer in der Umgebung und bilden sogenannte Brücken aus. Durch den nachfolgenden Denaturierungsschritt entstehen wieder einzelsträngige, auf der Oberfläche verankerte DNA-Fragmente (Cluster). Für die Sequenzierung der Cluster wird ein universeller Primer an die Adaptoren der DNA-Fragmente hybridisiert.

Die Sequenzierung der generierten Cluster erfolgt durch die Replikation des komplementären Strangs mit reversiblen Farbstoff-Terminatoren. Dieses sind Desoxynukleotide, die ein Fluorophor und an der 3'OH-Gruppe eine Blockierungsgruppe tragen. An die vier Nukleotide sind jeweils unterschiedliche Fluorophore gebunden. Da die Blockierungsgruppe die DNA-Synthese abbricht, wird der Strang jeweils nur um ein markiertes Nukleotid verlängert. Nicht eingebaute Nukleotide werden im Anschluss entfernt. Um die Analogie des eingefügten Nukleotids zu identifizieren, wird das Fluoreszenzsignal analysiert (Shendure & Ji, 2008).

2.6.8.4 Auswertung der Datensätze aus der Illumina- und FLX 454-Sequenzierung

Die de novo Assemblierung der Rohdaten erfolgte unter Verwendung des Softwareprogramms Velvet version 1.2.08 (Zerbino & Birney, 2008) am Heinrich-Pette-Institut, (Hamburg, Deutschland).

Für die funktionelle Charakterisierung der Sequenzen wurde die Plattform von IMG genutzt. Zur weiteren Analyse der biologischen Prozesse im Zusammenhang mit einzelnen Genen und offene Leserahmen (ORF), wurde vor allem die KEGG (Nakaya *et al.*, 2013), die COG (Tatusov *et al.*, 2001) und die Pfam (Finn *et al.*, 2008) Datenbanken verwendet.

Um die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft im Photobioreaktor zu untersuchen, wurden die ribosomalen RNA-Sequenzen der assemblierten FLX 454 und Illumina-Sequenzdaten mit den in der NCBI-Datenbank hinterlegten Sequenzen verglichen.

2.7 Methoden zur Enzymaktivitätsbestimmungen

2.7.1 Cellulolytische Aktivität der Mikroalgen - Bakterien - Metagenombank

Die erstellte Metagenombank aus der Gesamt-DNA der Mikroalgen-Bakterien-Kultur des Photobioreaktors, wurde mittels eines kolorimetrischen Tests auf cellulolytische Aktivität getestet. Der Plattentest basiert auf einer Interaktion des Farbstoffs Jod-Kaliumjodid mit löslichen, höherkettigen Glukanen, die sich aus β -1-4-glykosidisch verbundenen Glukose-Derivate zusammensetzen, wie beispielsweise die Carboxymethylcellulose (CMC, Abbildung 2.3) (Kasana *et* al., 2008).



Abbildung 2.3: Struktur Carboxymethylcellulose (CMC), http://www.lsbu.ac.uk/water/hycmc.html

Cellulolytisch aktive Klone spalten die β -1-4-glykosidischen Bindungen, wodurch kurzkettige Dextrine entstehen, welche von dem Jod-Kaliumjodid nicht angefärbt werden. Kolonien mit cellulolytischer Aktivität sind durch gelblich/orange Höfe gegen einen roten Hintergrund gekennzeichnet.

Die Klone der Metagenombank wurden als 48er Pool auf LB/CMC-Agarplatten gestempelt. Die Platten wurden bei 37 °C für 4 Tage inkubiert. Die Bakterienkolonien wurden mit $H_2O_{dest.}$ abgeschwemmt und mit einer Jod-Kaliumjodid Lösung überschichtet. Nach einer 5 minütige Inkubation bei RT, wurden die Platten mit 1 M NaCl-Lösung entfärbt.

2.7.2 Hydrolytische und lipolytische Aktivität der Mikroalgen - Bakterien -Metagenombank

Die hydrolytische oder lipolytische Aktivität der in der Algen-Bakterien-Metagenombank enthaltenen Fosmidklone wurde durch verschiedene Methoden untersucht.

Durch den Tributyrin-(TBT)-Plattentest kann generell hydrolytische Aktivität und somit auch lipolytische Aktivität detektiert werden.

Über *para*-Nitrophenylester (*p*NP), die unterschiedlich lange Fettsäurereste tragen, kann der Nachweis von Carboxylesterasen erfolgen, wobei ab einer Kettenlänge von 10 oder mehr C-Atomen nur noch Lipasen die Reaktion katalysieren können (Jaeger *et* al., 1999).

2.7.2.1 Plattentest mit Tributyrin (TBT)

Um die Klone der Algen-Metagenombank auf hydrolytische und lipolytische Aktivität zu prüfen, wurde der Tributyrin-(TBT)-Plattentest angewandt (Schmeisser, 2004; Elend *et* al., 2006). Dieser basiert auf einer Enzym-katalysierten, hydrolytischen Spaltung des Triglycerids Tributyrin, wobei Glycerin und Buttersäure gebildet werden (Abbildung 2.4).



Abbildung 2.4: Hydrolyse eines Lipides mit Hilfe einer Lipase als Katalysator

Für den TBT-Plattenassay wurde LB-Agar-Medium vor dem Autoklavieren mit 1% (v/v) Tributyrin versetzt. Das Medium wurde mit einem ULTRA TURRAX[®] T18 Basic-Homogenisator (IKA WORKS Inc., Wilmington, NC, USA) für einige Minuten emulgiert. Sofort im Anschluss wurde das Medium autoklaviert.

Um die Metagenombank auf aktive Klone zu untersuchen, wurden jeweils 48 Klone aus einer 96-Well-Mikrotiterplatte auf eine TBT-Agarplatte gestempelt und für 5 Tage bei 37 °C inkubiert. Klone mit Esterase- oder Lipase- Aktivität sind an der Bildung eines klaren Hofes um die Kolonie zu erkennen, der sich von der sonst trüben Platte abhebt.

2.7.2.2 *para*-Nitrophenylester (*p*NP) - Test

Bei *para*-Nitrophenylester handelt es sich um chromogene Substanzen, aus denen nach Hydrolyse das gelbe *p*-Nitrophenol abgespalten wird. Dieses kann mit dem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von OD_{405} nm quantitativ bestimmt werden.

Einzelne Klone, die im TBT-Plattentest klare Höfe zeigten, wurden durch diesen Test näher analysiert. Die Anzucht der Fosmide erfolgte über Nacht in 5 ml LB- Chloramphenicol (12,5 μ g/ml). Die Herstellung der Zellrohextrakte erfolgte analog zu 2.7.3.2.

Zunächst wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 427,5 μ l PB mit 47,5 μ l 10 mM *p*NP-Substrat, jeweils mit einer Kettenlänge von C12-C18 (gelöst in 96% Ethanol oder Isopropanol, Tab.: 2.9) versetzt. Nach Zugabe von 25 μ l Zellrohextrakt erfolgte eine Inkubation von 15 - 30 Min. bei 37 °C. Die Reaktion wurde gestoppt, indem die Proben auf Eis gestellt wurden. Trübe Partikel aus der Probenflüssigkeit wurden für 5 Min. bei 2 °C und 12.000 x g zentrifugiert. Zur Bestimmung der Extinktion wurden die Proben in Einmalküvetten (Ratiolab GmbH, Dreieich-Buchschlag, Deutschland) überführt und gegen einen enzymfreien Leerwert bei einer OD₄₀₅ nm gemessen. Bei Esterase- oder Lipase-positive Proteinextrakten führte die Reaktion zu einem gelben Farbumschlag der Flüssigkeit.

Analog wurde direkt die Esterase- und Lipase-Aktivität im Überstand der Mikroalgenkultur unter Verwendung verschiedener *p*NP-Substrate (Tabelle 2.9) getestet. Hierzu wurde der Kulturüberstand abzentrifugiert und zweimal sterilfiltriert. Die zellfreie Probe (25 μ l) wurde mit 47,5 μ l 10 mM *p*NP-Substrat (C2 - C18) und 425 μ l PB-Puffer versetzt. Nach einer Inkubation von 60 Min. bei 22 °C wurde die Reaktion auf Eis gestoppt. Nachdem trübe Partikel abzentrifugiert (fünf Min., 2 °C, 12.000 x g) wurden, erfolgte die Messung der Extinktion bei OD₄₀₅ nm.

| pNP- | C-Kettenlänge |
|--|---------------|
| Acetate [C ₈ H ₇ NO ₄] | 2 |
| Butyrate [C ₁₀ H ₁₁ NO ₄] | 4 |
| Octanoate [C ₁₄ H ₁₉ NO ₄] | 8 |
| Decanoate [C ₁₆ H ₂₃ NO ₄] | 10 |
| Laurate [C ₁₈ H ₂₇ NO ₄] | 12 |
| Myristate [C ₂₀ H ₂₇ NO ₄] | 14 |
| Palmitate [C ₂₂ H ₂₇ NO ₄] | 16 |
| Stearate [C ₂₄ H ₂₇ NO ₄] | 18 |

Tabelle 2.9: para-Nitrophenylester, die in dieser Arbeit verwendet wurden

2.7.3 Identifizierung funktioneller Gene mit potentieller biofilminhibierender Wirkung aus Metagenombanken

2.7.3.1 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1-Überschichtungsassay

Jeweils 48 Metagenomklone einer Metagenombank ("Teufelsbrück"; Krohn, 2010) wurden auf eine LB-Agarplatte gestempelt und für 72 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nachdem die Klone angewachsen waren, wurden die Kolonien über Chloroform fünf Minuten lysiert. Zum abdampfen möglicher Chloroformreste wurden die Platten offen unter der Sterilbank für 10 Min. stehen gelassen. Im Anschluss wurden die Platten mit einer dünnen Schicht LB-Agar überschichtet. Daraufhin wurden je 200 µl *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 einer Flüssigkultur (OD₅₇₈ nm = 0,5) ausplattiert und erneut bei 37 °C für 24 Stunden inkubiert. Die Auswertung der Platten erfolgte optisch. Metagenomklone, die einen Hemmhof ausbildeten und somit *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in seinem Wachstum inhibierten, wurden als positiv vermerkt und mit dem *Staphylococcus epidermidis*-Biofilmdesintegrationsassay (2.5.3) erneut überprüft. Insgesamt wurden 10.080 Klone der Elbsediment-Metagenombank von Teufelsbrück untersucht.

2.7.3.2 Biofilminhibierungsassay im Mikrotitermaßstab – Zellaufschluss und Gewinnung von Zellrohextrakten

Die aus dem Überschichtungsassay positiv ermittelten Metagenomklone wurden in 5 ml LB-Medium (12,5 µg/ml Chloramphenicol) über Nacht bei 37 °C schüttelnd bei 180 rpm angezogen. Die über Nacht Kulturen wurden bei 5.000 x g und 4 °C 10 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde separat in einem sterilen Eppendorfgefäß gesammelt, um mögliche extrazelluläre Substanzen zu testen. Das Zellpellet wurde in 500 µl Phosphatpuffer (0,2 M, pH: 7,0-7,2) resuspendiert und auf Eis per Ultraschall bei einer Amplitude von 60% und einem Cycle von 0,5 für 10 Min. lysiert. Anschließend wurden die Zelltrümmer aus dem Lysat bei 11.000 x g und 4 °C für 2 Min. abzentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und kann bei 4 °C mehrere Tage gelagert werden.

Phosphatpuffer (PB)

| Kaliumdihydrogenphosphat [KH ₂ PO ₄] | 0,2 M |
|---|-------|
| Dikaliumhydrogenphosphat $[K_2HPO_4]$ | 0,2 M |

Phosphatpuffer (PB) pH: 7,2

| Kaliumdihydrogenphosphat [KH ₂ PO ₄] (0,2 M) | 39 ml |
|---|-------|
| Dikaliumhydrogenphosphat [K ₂ HPO ₄] (0,2 M) | 61 ml |

Die Lösungen wurden getrennt voneinander autoklaviert und im Anschluss im entsprechenden Volumen vereinigt.

Die erhaltenen Überstände und Zellrohextrakte wurden in 96er Mikrotiterplatten in unterschiedlichen Volumina $(5 \,\mu l - 200 \,\mu l)$ vorgelegt und mit den Flüssigkulturen der Testorganismen (2.5.3) gemischt.

2.8 Biochemische- und chemisch- analytische Methoden

2.8.1 Bestimmung von Proteinen

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte nach einer von Frølund *et* al. (1996) modifizierten Methode von Lowry *et* al. (1951). Das Prinzip beruht dabei auf der Biuret-Reaktion von Peptidbindungen mit Cu^{2+} -Ionen.

Zu 0,5 ml zellfreier EPS-Probe (2.5.5) wurden 0,7 ml Lowry-Reagenz gegeben und gemischt. Nach 10 Min. Inkubation bei Raumtemperatur wurden 0,1 ml Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz hinzugegeben und sofort gemischt. Im Anschluss einer 45 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei OD₇₅₀ nm photometrisch gemessen. Die Proben wurden dreifach angesetzt.

| Lösung 1: | 0,143 M Natriumhydroxid [NaOH] | | |
|-----------|---|--|--|
| | 0,270 M Natriumcarbonat [Na ₂ CO ₃] | | |
| Lösung 2: | 0,057 M Kupfersulfat [CuSO ₄] | | |
| Lösung 3: | 0,124 M Natriumtartrat-Dihydrat [C ₄ H ₄ Na ₂ O ₆ x 2 H ₂ O] | | |
| | | | |

Als Lösungsmittel diente H₂O.

| Lowry-Reagenz: | Lösung 1, 2 und 3 wurden im Volumenverhältnis 100:1:1 | | |
|-------------------|--|--|--|
| | gemischt. | | |
| Folin-Ciocalteus- | 2,5 ml Folin-Ciocalteu-Phenolreagenzes (Fa. Merck) wurden in | | |
| Phenolreagenz: | 3 ml H ₂ O verdünnt. | | |
| Stammlösung: | 200 µg/ml Rinderserumalbumin (Fa. Sigma) | | |

2.8.2 Bestimmung von Kohlenhydraten

Die Bestimmung von Kohlenehydraten in zellfreien EPS erfolgte mittels eines Phenol-Schwefelsäure-Tests nach Dubois *et* al. (1956).

Zu 0,5 ml Probe wurden 0,5 ml Phenol-Lösung gegeben und durchmischt. Im Anschluss wurden 2,5 ml konz. Schwefelsäure hinzugegeben und wiederum gemischt. Es wurden jeweils drei Ansätze hintereinander behandelt, da Phenol-Lösung und Schwefelsäure möglichst schnell hintereinander zugegeben werden sollten. Die Ansätze wurden nach einer 10 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur für 15 Min. im Wasserbad bei 30 °C erhitzt. Nach einer weiteren 5 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Absorptionen der Proben im Photometer zum einem bei OD_{480} nm für saure Polysaccharide (z. B. Alginat) und bei OD_{490} nm für neutrale Polysaccharide (z. B. Dextran) gemessen. Die Proben wurden dreifach angesetzt.

| Reagenzien: | konz. Schwefelsäure |
|--------------|------------------------|
| | 5% (w/v) Phenol-Lösung |
| Stammlösung: | 100 μg/ml Dextran |
| | 200 μg/ml Alginat |

2.8.3 Bestimmung von Uronsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Uronsäure in der extrazellulären polymeren Substanz erfolgte durch eine Sulfamat-Hydroxybiphenyl-Reaktion nach Filisetti-Cozzi & Carpita (1991).

Zu 0,4 ml Probe wurden jeweils 40 μ l Lösung 1 pipettiert und durchmischt. Im Anschluss wurden 2,4 ml Lösung 2 zugegeben und gemischt. Daraufhin wurden die Ansätze für 20 Min. bei 100 °C im Wasserbad erhitzt. Dann wurden die Proben für 5 Min. im Eisbad abgekühlt und es wurden 80 μ l Lösung 3 zugegeben. Die Proben wurden gründlich durchmischt und nach 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption aller Ansätze wurde bei OD₅₂₅ nm photometrisch gemessen. Die Proben wurden dreifach angesetzt.

| Lösung 1: | 4 M Sulfaminsäure [H ₃ SO ₃ N] in H ₂ O lösen (pH Wert: 1,6) | | | |
|--------------|--|--|--|--|
| Lösung 2: | 0,075 M Natriumtetraborat-Decahydrat $[Na_2[B_4O_5(OH)_4] \ge 8 H_2O]$ in konz. Schwefelsäure lösen $[H_2SO_4]$ | | | |
| Lösung 3: | 0,15% (w/v) m-Hydroxybiphenyl [$C_{12}H_{10}O$] in 0,5% iger (w/v) Natriumhydroxid [NaOH]-Lösung | | | |
| Stammlösung: | 100 μg/ml D-Glucuronsäure | | | |
| | 200 μg/ml Alginat | | | |

2.8.4 Bestimmung des Gesamt-Lipidgehaltes

Der Lipidgehalt wird in der Regel durch Extraktion mit lipophilen Lösungsmitteln wie (n)-Hexan bestimmt (Hara & Radin, 1978).

Zu 0,5 ml der zu analysierenden EPS-Probe wurden 0,5 ml (n)-Hexan zugegeben und 30 Min. schüttelnd bei RT homogenisiert. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation für 90 Sek. bei

12.000 x g. Die obere Phase (Hexan und Lipide) wurde in ein zuvor abgewogenes Glasgefäß unter Vermeidung der Interphase überführt. Die Lösung wurde getrocknend und das Glasgefäß erneut gewogen.

2.9 Softwareprogramme und Datenbanken

In dieser Arbeit wurden die im Folgenden aufgeführten Softwareprogramme sowie die Datenbanken mit ihren Bezugsquellen verwendet.

2.9.1 Softwareprogramme

| BioEdit | http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html | | |
|--------------|--|--|--|
| CloneManager | http://www.scied.com/pr_cmbas.htm | | |
| Finch TV | http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml | | |
| QIIME | http://qiime.org/ | | |
| velvet | http://www.ebi.ac.uk/~zerbino/velvet | | |

2.9.2 Datenbanken

| NCBI Database | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ |
|--|--|
| - BLAST Alignment tools | http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi |
| - GenBank® Sequence database | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/ |
| DOE Joint Genome Institute/ IMG/mer | http://www.jgi.doe.gov/ |
| IMG/mer (integrated microbial genomes) | https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/mer/main.cgi |

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Charakterisierung bakterieller Populationen von Biofilmen eines Plattenphotobioreaktors. Zur genaueren Betrachtung wurden die Mikroalgenarten *Chlorella vulgaris* und *Scendesmus obliquus* herangezogen, welche in einer Photobioreaktor-Pilotanlage in Hamburg-Reitbrook mit Sonnenlicht und Rauchgas aus einem Blockheizkraftwerk kultiviert wurden. Die molekularbiologischen, mikrobiologischen und ökophysiologischen Zusammenhänge wurden durch kulturabhängige Methoden sowie über die Analyse des Metagenoms aufgezeigt. Vor dem Hintergrund, dass die Biofilmbildung die Produktivität der Pilotanlage und das Wachstum der Mikroalgenkultur beeinträchtigten, sollten Möglichkeiten zur Biofilminhibierung von Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien aufgezeigt werden. Hierzu wurden molekularbiologischen Methoden und funktionsbasierte Untersuchungen verwendet.

3.1 Mikrobiologische und chemische Analysen des Mikroalgen und Bakterien Konsortiums

Die Dokumentation der Biofilmentwicklung innerhalb des Plattenphotobioreaktors erfolgte über einen Zeitraum von 12 Wochen (Abbildung 3.1 T1-T5).



Abbildung 3.1: Biofilmentwicklung in dem Plattenphotobioreaktor (L1/1) der Pilotanlage Hamburg-Reitbroock über einen Zeitraum von 12 Wochen. T1 nach zwei Wochen, T2 nach vier Wochen, T3 nach sechs Wochen, T4 nach acht Wochen, T5 nach 12 Wochen Inokulation. Nach der Inokulation des PBRs (T0) wurde auf dessen Rückseite eine Lichtintensität von 150 μ mol/m²s gemessen. Die Lichtintensität zum Zeitpunkt T5 lag im Bereich von 10 μ mol/m²s.

Es wurden insgesamt sechs Zeitpunkte (T0 - T5) analysiert. Zum Zeitpunkt T0 konnte keine Biofilmbildung beobachtet werden. Bereits 14 Tage nach der Inokulation des Photobioeaktors konnte ein lockerer Belag auf den Reaktorwänden beobachtet werden (T1). Im weiteren Verlauf (T2 - T4) wurde eine umfangreiche Biofilmbildung dokumentiert, welche an Stabilität zunahm. Der Biofilm heftete sich dicht an die Oberfläche des Reaktors und erstreckte sich nach 12 Wochen (T5) über den gesamten Photobioreaktor.

Um einen Einblick in die phylogenetische Zuordnung und die morphologische Vielfalt der Mikoorganismen im Biofilm zu erhalten, wurden zunächst verschiedene Proben mikroskopisch untersucht. Die Analyse der extrazellulären Substanzen sollte ferner Aufschluss über die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Biofilme geben, um so Kenntnisse über deren strukturelle Integrität zu erhalten.

3.1.1 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Mittels der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung können Anreicherungskulturen, bzw. Umweltproben, hinsichtlich ihrer phylogenetischen Zusammensetzung analysiert werden. Hierzu wurden domänenspezifische Sonden gegen die 16S rRNA eingesetzt. Es ist somit möglich, die Vielfalt von Populationen aus verschiedensten Habitaten zu analysieren.

Die hier verwendeten Proben des Photobioreaktores wurden mittels spezifischer Sonden auf das Vorhandensein von Bakterien (EUB 338I) und Archaeen (Arch 915) hin überprüft (Abbildung 3.2).



Abbildung 3.2: Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen (Axio Imager.Z1, AxioVision© AxioVs40 V 4.7.2.0) einer Probe des Freiland-Photobioreaktors in Hamburg-Reitbrook, rosa/lila farbig (Pfeil): Zellen, welche mit der Eubakterien-Sonde (EUB 338I) hybridisierten; blau gefärbt (gestrichelter Pfeil): Strukturen, welche mit DAPI angefärbt sind.

Es konnten eindeutige Fluoreszenzsignale mit der Bakterien-spezifischen Sonde EUB 338I ermittelt werden, wodurch eine taxonomische Zuordnung der Mikroorganismen zu den Domänen der Bacteria möglich war. Durch Untersuchungen mit der Archaeen-spezifischen Sonde Arch 915 konnten keine Signale nachgewiesen werden. Aus der Abbildung 3.2 A-C geht hervor, dass die Morphologie der Bakterien von Kokken bis stäbchenförmig reicht. Überwiegend waren hierbei Stäbchen unterschiedlicher Morphologie zu erkennen. Ebenso konnten gekrümmte Stäbchen gezeigt werden, welche eine durchschnittliche Größe von 0,5-2 μ m aufwiesen. Die Kokken hatten einen Durchmesser von ca. 0,5 μ m. Darüber hinaus war der Anteil, der mit DAPI gefärbten und mit der Bakterien-spezifischen Sonde EUB 338I dedektierten Bakterien im Verhältnis zu den mit DAPI gefärbten Mikroalgen hoch. Eine gut gewachsene Kultur beinhalten ca. 6,38 x 10⁷ Mikroalgen/ml und 4,61 x 10⁸ Bakterien/ml.

3.1.2 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die Rasterelektronenmikroskopischen Abbildungen zeigten eine mehrschichtige und komplexe Struktur der gebildeten Biofilme im Plattenphotobioreaktor (Abbildung 3.3 A-D).



Abbildung 3.3: A: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Algen-Bakterien-Kultur (REM LEO 1525, 5.00 kV). Der Größenmaßstab von 1 μ m ist in der Abbildung enthalten. Die Pfeile zeigen auf stäbchenförmige Bakterien. Der gestrichelte Pfeil zeigt auf die zitronen-förmige Zelle (8 - 9 μ m) von *Scenedesmus obliquus*.



Abbildung 3.3: B: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Algen-Bakterien-Kultur (REM LEO 1525, 5.00 kV). Der Größenmaßstab von 1 µm ist in der Abbildung enthalten. Die Pfeile zeigen auf stäbchen- und kokkenförmige Bakterien. Der gestrichelte Pfeil zeigt auf die zitronen-förmige Zelle (8 - 9 µm) von *Scenedesmus obliquus*.



Abbildung 3.3: C: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Algen-Bakterien-Kultur (REM LEO 1525, 5.00 kV). Der Größenmaßstab von 1 µm ist in der Abbildung enthalten. Die Pfeile zeigen auf mögliche Haftorgane und Fortsätze der Bakterien.



Abbildung 3.3: D: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Algen-Bakterien-Kultur (REM LEO 1525, 5.00 kV). Der Größenmaßstab von 2 µm ist in der Abbildung enthalten. Die Pfeile zeigen auf die Fäden der EPS.

Unter der Nutzung von extrapolymeren Substanzen formten die Mikroalgen ein Netzwerk mit den Bakterien. Die morphologischen Unterschiede der Bakerien reichten von kugelförmig über Kugelketten bis zu dreidimensionale Formationen von Kokken sowie zylindrische Formen (Stäbchen) mit mehr oder minder abgerundeten Enden. Darüber hinaus waren verschiedene Fortsätze und Haftorgane sichtbar.

3.1.3 Analyse der extrazellulären polymeren Substanzen (EPS)

Die Zusammensetzung der EPS bestimmt im Wesentlichen die physikalischen und chemischen Eigenschaften eines Biofilms (Flemming & Wingender, 2010).

Für die Bestimmungen wurde entsprechende Biomasse von den bewachsenen Wänden des Photobioreaktors genutzt. Für die Isolierung der extrazellulären polymeren Substanzen wurde diese Biomasse zunächst in 0,14 M NaCl (1:16) suspendiert und die Zellen durch Zentrifugation und über Membranfilter entfernt (2.5.5). Die zellfreie EPS-Lösung wurde durch verschiedene Analysen auf die chemische und biochemische Zusammensetzung hin überprüft (2.8, Abbildung 3.4).



Abbildung 3.4: Gehalt an Biopolymeren der extrazellulären polymeren Substanzen aus der Biofilmenprobe T5. Der DNA-Gehalt lag bei < 4 ng/mg Frischgewicht. Die Daten entsprechen den Mittelwerten von mindestens drei Wiederholungen. Die Fehlerindikatoren zeigen eine einfache Standardabweichung.

Die quantitativen Messungen der einzelnen EPS-Komponenten zeigten, dass die hier vorliegende Biofilmprobe hauptsächlich aus neutralen und sauren Polysacchariden (11,60 mg/g Biofilm), Fettsäuren (10,40 mg/g Biofilm), Proteinen (3,77 mg/g Biofilm), Uronsäuren (0,82 mg/g Biofilm) und sehr geringe Mengen an DNA (<4 ng/mg Biofilm) zusammengesetzt war.

3.2 Populationsstruktur der Algen-assoziierten bakteriellen Gemeinschaft

Es wurden verschiedene Strategien verwendet, um die mikrobielle Vielfalt in den Biofilmproben zu untersuchen. Die Analyse der Populationsstruktur erfolgte durch Amplifikation und Sequenzierung der 16S rRNA Genfragmente (Konstruktion einer Klonbibliothek, DGGE, RFLP). Weiterhin konnten einzelne bakterielle Arten durch kultivierungsabhängige Methoden isoliert werden.

3.2.1 Phylogenetische Einordnung des bakteriellen Konsortiums

Die phylogenetische Einordnung der einzelnen Arten erfolgte in erster Linie mittels Analyse der 16S rRNA-Gene (Lane, 1991). Für die Analysen wurden entweder direkt die Proben oder

die extrahierte Gesamt-DNA (2.6.4.1) aus den Biofilmen in verschiedenen Entwicklungsstadien (T1-T5) und der nicht-axenischen Starterkultur (T0) verwendet.

Die 16S rRNA-Gene wurden durch die Verwendung von Standard-Primern (27f und 1492r; Lane, 1991) amplifiziert und die erhaltenen DNA-Fragmente in den Vektor pDrive ligiert und in chemisch kompetente *E. coli* Top10 DH10B-Zellen transformiert (2.6.7.1). Die Insert-DNA dieser Klone wurde vollständig sequenziert (2.6.8.1). Die Auswertung und Editierung der erhaltenen Sequenzen wurde mit dem Softwareprogramm FinchTV Sequence Alignment Editor und Bioedit durchgeführt. Nach Entfernung von potentiellen Chimären und Duplikaten wurden insgesamt 201 vollständig sequenzierte 16S rRNA-Genfragmente aus der Biofilmprobe (T5) über eine Rarefaction-Analyse unter Verwendung von QIIME 1.4.0 (Kuczynski *et* al., 2011) näher analysiert (Abbildung 3.5, Tabelle 3.1).



Abbildung 3.5: Rarefaction-Kurve. Anzahl der Operativen taxonomischen Einheiten (OTUs) innerhalb der 16S rRNA-Gen-Bibliothek aus der PBR Biofilmprobe (T5) nach Filterung der Chloroplasten-Sequenzen. Die Analyse wurde mit QIIME (Kuczynski *et* al., 2011) berechnet. Die OTUs sind im 1, 3 und 20% genetischem Abstand gezeigt.

Die Analyse der 16S rRNA-Gensequenzen (KC994681 zu KC994881) zeigte 28 OTUs bei einer > 99%igen Homologie für bakterielle 16S rRNA-Gene. Die Rarefaction Kurve erreichte eine Sättigung bei 20% (Phylum-Ebene) und 3% (Gattungs-Ebene).

| genetischer Abstand | Diversität ^a | | | | | |
|------------------------|---------------------------------|------------------|--------------------|----------------------|-----------------------------------|----------------------|
| | Anzahl der Spezies ^b | ACE ^c | Chao1 ^d | Shannon ^e | Michaelis- Menten ^f | Simpson ^g |
| 0,01 | 28 | 29,105 | 28,750 | 3,01303 | 35,352 | 0,948 |
| 0,03 | 27 | 28,129 | 27,750 | 2,98895 | 33,905 | 0,946 |
| 0,2 | 11 | 11,818 | 11,500 | 1,19327 | 13,929 | 0,527 |

Tabelle 3.1: Diversität der bakteriellen 16S rRNA der T5 Biofilmprobe (Rarefaction-Analyse, QIIME 1.4.0)

^aDie Werte wurden unter Verwendung von QIIME berechnet. ^bDie Anzahl der ermittelten Spezien ist als Anzahl der OTUs ausgedrückt. ^cACE ist eine nichtparametrische Schätzfunktion, wobei Werte von > 10 eine hohe und Werte von < 10 OTUs eine geringe Diversität beschreiben. ^dChao1 ist eine nichtparametrische Schätzfunktion. ^eShannon, Shannon-Weaver-Index der Diversität. Eine hohe Zahl deutet auf eine hohe Diversität hin. ^fEntspricht Vmax. ^gÜbersicht zur Vielfalt zwischen 0-1. 1 deutet auf eine hohe Vielfalt hin.

Die Analyse zeigte, dass die gesamte Vielfalt der bakteriellen Gemeinschaft eher limitiert war. Es wurde ein Shannon-Weaver-Index von 3,01 auf Speziesebene ermittelt. Diese Ergebnisse zusammen mit den Chao1 und ACE Schätzungen (Tabelle 3.1) zeigten, dass ein signifikanter Anteil der bakteriellen Diversität analysiert wurde. Insgesamt kann gesagt werden, dass nicht mehr als 30 verschiedene Arten innerhalb der Photobioreaktors vertreten waren.

Die untersuchten bakteriellen 16S rRNA Gensequenzen wurden hauptsächlich als Vertreter der Alpha- und Betaproteobacteria (Abbildung 3.6) identifiziert. Darüber hinaus wurde eine beträchtliche Anzahl von 16S rRNA Gensequenzen zum Phylum der Bacteroidetes zugeordnet. Insgesamt wurde der überwiegende Anteil der 16S rRNA Gensequenzen zu den Familien der Sphingomonadaceae (6%), Caulobacteraceae (8%), Rhizobiaceae (8%), Comamonadaceae (12%), Xanthomonadaceae (7%), Sphingobacteriaceae (8%) und Flavobacteriaceae (5%) zugeordnet.


Abbildung 3.6: Phylogenetische Zuordnung der 16S rRNA Insert-Sequenzen aus der Klonbibliothek des PBR-Biofilms (T5) mit Referenz-Sequenzen aus der NCBI Datenbank. Zur Bearbeitung der 16S rRNA Gensequenzen wurden die Programme Finch TV und BioEdit verwendet.



Abbildung 3.7: DGGE-Profil der amplifizierten 16S rRNA-Genfragmente. 8% iges Harnstoff-Formamid Gel. Die Spuren 1-6 repräsentieren die unterschiedlichen Zeitpunkte (T0-T5) der Probennahme in 14-tägigen Abständen. Die verschiedenen DGGE-Banden (1-13) repräsentieren die 16S rRNA-Genfragmente der assoziierten Mikroorganismen. (1) *Pedobacter* sp., (2) *Flavobacterium* sp., (3) *Acidovorax* sp., (4) *Rhodobacter* sp., (5) Plastid: *Nitzschia frustulum*, (6) Chloroplast: *Scenedesmus obliquus*, (7) Chloroplast: *Chlorella vulgaris*, (8) Bacteroidetes bacterium, (9) *Sinorhizobium* sp., (10) *Caulobacter* sp., (11) unkultiviertes Bacteroidetes bacterium, (12) unkultiviertes Bacteroidetes bacterium, (13) Gemmatimonadetes bacterium. Weitere Daten aus der Denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE) der unterschiedlichen Zeitpunkte während der Biofilmbildung (T1-T5) und der Starterkultur (T0) unterstützten diese Befunde. Das DGGE-Profil der einzelnen Proben (Abbildung 3.7) in Kombination mit den Sequenzen aus der 16S rRNA-Analyse (KC994651 bis KC994663) zeigte, dass die phylogenetische Struktur des Biofilms über den gesamten Zeitraum relativ stabil war. Die Daten zeigten auch, dass ein Großteil der ermittelten Mikroorganismen im PBR bereits in der Starter-Kultur (T0) vorhanden war.

| DGGE- Bande | Phylogenetische Gruppe | Phylogenetische Zuordnung | Überein- stimmung [%] |
|----------------|---------------------------|--|--------------------------|
| 1 | Bacteroidetes | Pedobacter sp. (EU585748.1) | 87 |
| 2 | Bacteroidetes | Flavobacterium sp. (JX827624.1) | 92 |
| 3 | Betaproteobacteria | Acidovorax sp. (KC464816.1) | 96 |
| 4 | Alphaproteobacteria | Rhodobacter sp. (KC157045.1) | 93 |
| 8 | Bacteroidetes | Bacteroidetes bacterium (HM205113.1) | 86 |
| 9 | Alphaproteobacteria | Sinorhizobium sp. (JQ316267.1) | 98 |
| 10 | Alphaproteobacteria | Caulobacter sp. (EF020225.1) | 90 |
| 11 | Bacteroidetes | unkultivierbares Bacteroidetes bacterium (DQ463716.2) | 86 |
| 12 | Bacteroidetes | unkultivierbares Bacteroidetes bacterium (AY874003.1) | 86 |
| 13 | Gemmatimonadetes | Gemmatimonadetes bacterium (JQ177808.1) | 97 |
| 5 | Plastid | Nitzschia frustulum (AY221721.1) | 99 |
| 6 | Chloroplast | Scenedesmus obliquus (DQ396875.1) | 99 |
| 7 | Chloroplast | Chlorella vulgaris (AB001684.1) | 97 |

Tabelle 3.2: Zuordnung der DGGE-Banden zu den phylogenetischen Gruppen und nächsten Verwandten inklusive der prozentualen Übereinstimmungen.

Die Bandenbeschriftungen bezeichnen die extrahierten und sequenzierten DNA-Banden. Sie sind in Tabelle 3.2 mit der Zuordnung in die phylogenetischen Gruppen und den ermittelten prozentualen Übereinstimmungen zusammenfassend aufgeführt. Die Banden 1, 2, 8 und 12 konnten dem Phylum der Bacteroidetes zugeordnet werden. Die DGGE-Banden 4, 9 und 10 repräsentierten Alphaproteobacteria. Das Sub-Phylum der Betaproteobacteria konnte in Bande

3 nachgewiesen werden; sowie Gemmatimonadetes in Bande 13. Darüber hinaus konnten verschiedene eukaryotische Plastide und Chloroplasten in den Banden 5, 6 und 7 identifiziert werden.

Weiterhin wurden etwa 100 Klone aus jeder Probe (T0-T5) durch Restriktionslängenpolymorphismus analysiert. Restringierte PCR-Produkte, welche unterschiedliche Bandenmuster zeigten, wurden sequenziert und die 16S rRNA Genabschnitte in der NCBI-Datenbank hinterlegt (KC994664 bis KC994680). Insgesamt konnten 17 verschiedene Bandenmuster ermittelt werden (Abbildung 3.8).



Abbildung 3.8: Phylogenetische Zuordnung der 16S rRNA Gensequenzen aus der RFLP Analyse der Proben T0 - T5. Deltaproteobacteria:

unkultiverbare Deltaproteobacteria, Alphaproteobacteria:
Sphingomonadaceae bacterium,

Sphingomonas sp.,
Phaeospirillum sp.,
Brevundimonas sp.,

Sinorhizobium sp., Betaproteobacteria:

Polaromonas sp.,
Acidovorax sp.,

Comamonadaceae bacterium, Bacteroidetes:

Pedobacter sp.,
Bacteroidetes bacterium,
Flavobacterium sp.,
Bacteroidetes bacterium,
Scenedesmus obliquus,
Chlorella vulgaris.

Im Inokulum zur Beimpfung der PBR konnten hauptsächlich der Chloroplast der zu kultivierenden Mikroalge sowie Vertreter der Sphingomonadaceae, Rhodospirillaceae, Rhizobiaceae (Alphaproteobacteria), Comamonadaceae (Betaproteobacteria), Sphingobacteriaceae, Flavobacteriaceae und Chitonophagaceae (Bacteroidetes) nachgewiesen werden. Die Kolonisierung der Oberfläche der Photobioreaktoren setzte sich aus diesen Vertretern der Alpha- und Betaproteobacteria sowie aus Mitgliedern der Bacteroidetes und den Mikroalgen *Scenedesmus obliquus* und *Chlorella vulgaris* zusammen.

3.2.2 Kultivierung und Isolierung von Mikroorganismen aus dem PBR

Anfängliche Versuche, Bakterien aus der Mikroalgenkultur auf unterschiedlichen Festmedien (LB, TY, R2A, TSB, NB) bei 22°C unter aeroben und anaeroben Bedingungen zu kultivieren, resultierte in der Isolierung von zwei Reinkulturen. Durch die Sequenzierung der 16S rRNA konnten diese beiden Isolate den Gattungen *Brevundimonas* (JQ661035.1, Isolat A) und *Paracoccus* (JQ404485.1, Isolat B) (Tabelle 3.3) zugeordnet werden. Interessanterweise führte die Zugabe von unterschiedlichen Mengen des Kulturüberstandes einschließlich lebender Zellen zu den Festmedien zu einer Stimulation des Wachstums von sechs weiteren Bakterienarten (Tabelle 3.3, Abbildung 3.9).

| Bakterielle Isolate | Phylogenetische Zuordnung | Übereinstimmung [%] |
|------------------------|--|------------------------|
| А | Brevundimonas sp. (JQ661035.1) | 94 |
| В | Paracoccus sp. (JQ404485.1) | 96 |
| С | Chryseobacterium taichungense (JQ071521.1) | 99 |
| D | Brevibacterium sp. / Arthrobacter sp. (GQ199748.1) | 99 |
| E | unkultivierbares Bakterium / Roseomonas sp. (HQ588850.1) | 78 |
| F | unkultivierbares CFB Bakterium (AJ583211.1) | 96 |
| G | Xanthomonas sp. (EU887990.1) | 99 |
| Н | Rhodococcus sp. (EU041710.1) | 99 |

Tabelle 3.3: Isolate aus der mikrobiellen Gemeinschaft des PBR's

Die 16S rRNA Gensequenz von Isolat C zeigte die größte Übereinstimmung zu *Chryseobacterium taichungense* YNB68 (JQ071521.1). Isolat D konnte zu einer nicht weiter charakterisierten *Brevibacterium*-Spezies (GQ199748.1) zugeordnet werden. Beide Isolate (C und D) wurden auf R2A Agarplatten mit 50% (v/v) Algenkultur als Zusatz isoliert. Der nächste Verwandte von Isolat E war ein Vertreter der Gattung *Roseomonas*. Die 16S rRNA Gensequenz ergab eine Ähnlichkeit von 78% zu *Roseomonas* sp. (HQ588850.1). Isolat E wurde durch Zusatz von 25% (v/v) Algenkultur auf NB-Agarplatten kultiviert. Die 16S rRNA

Analyse von Isolat F ergab, dass dieser Stamm einem noch unkultivierten Bakterium der Cytophaga-Flexibacter-Bacterioides Gruppe S15d-MN13 (AJ583211.1) zuzuordnen war. Isolat G konnte einem bisher unkultivierten Gammaproteobakterium Klon L4 (EU887990.1) zugeordnet werden. Durch die 16S rRNA Analyse von Isolat H konnte dieses Isolat mit 99% iger Übereinstimmung als *Rhodococcus* sp. 3/2 (EU041710.1) identifiziert werden. Die Isolate F und H wurden auf NB-Medium mit Zusatz von 50% (v/v) Algenkultur isoliert.

Insgesamt konnten nur wenige Bakterien unter Laborbedingungen kultiviert werden (KC994882 bis KC994889). Erste mikroskopische Analysen der Isolate zeigten verschiedene Kokken und Stäbchen von unterschiedlicher Größe und Form sowie diverse Fortsätze (Abbildung 3.9).



Abbildung 3.9: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Isolate A-H nach Negativkontrastierung (Leo 906E)

Brevundimonas sp. (A) war als stäbchenförmige Struktur (5 µm) mit Flagellenartigen Fortsätzen zu beobachten. Abbildung B zeigte das Isolat *Paracoccus* sp. als kokkenförmiges Bakterium von 1-1,5 µm Durchmesser. Die Form der Zellen von *Chryseobacterium taichungense* (C) war als Stäbchen (3 µm) mit abgerundeten Enden sichtbar. Die Elektronenmikroskopischen Aufnahmen für *Brevibacterium* sp. / *Arthrobacter* sp. (D) zeigten Strukturen von kettenförmigen Kurzstäbchen. In Abbildung E (unkultivierbares Bakterium / *Roseomonas* sp.) wurden stäbchenförmige Strukturen mit einer Größe von ca. 4-6 µm dokumentiert. Die Zellform für Isolat F (unkultivierbares CFB Bakterium) war als Stäbchen (2-3 µm) mit abgerundeten Enden erkennbar. Die Form der Zellen von *Xanthomonas* sp. (G) war stäbchenförmig $(1 \ \mu m)$ mit runden Enden. Abbildung H zeigte das Isolat *Rhodococcus* sp. als stäbchenförmiges Bakterium mit einer Größe von ca. 2 μm .

3.3 Analyse des bakteriellen Metagenoms des Mikroalgen -Bakterien - Konsortiums der Photobioreaktoren

Bis dato ist unser Wissen über die Physiologie und möglicher Stoffwechselleistungen komplexer mikrobieller Gemeinschaften, welche mit eukaryotischen Mikroalgen assoziiert sind, sehr begrenzt. Die vorliegenden partiellen Metagenomsequenzen des PBR-Biofilms ermöglichten eine Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft sowie deren potenziellen metabolischen Funktionen.

Die isolierte Gesamt-DNA sollte neben einen hohen Reinheitsgrad auch in einer hohen Konzentration vorliegen. Mittels einer modifizierten Extraktionsmethode nach (Yeates *et* al., 1998), welche die zusätzliche Verwendung von Lysozym, Proteinase K und TWEEN 80 beinhaltet, konnte DNA mit ausreichender Integrität (319,7 ng/µl; $OD_{260/280}$: 1,82) aus dem Biofilm des Photobioreaktors isoliert werden (Krohn-Molt *et* al., 2013).

Durch einen kombinierten Ansatz der Sequenzierung aus "GS FLX Titanium von Roche" und "HiSeq 2000 von Illumina" konnten umfangreiche Sequenzdaten des Metagenoms erfasst werden (Tabelle 3.4).

Dieses Projekt wurde der GenBank BioProject Nummer: PRJNA197241 zugeordnet. Die Rohdaten aus der Illumina- und FLX 454- Sequenzierung wurden in dem NCBI Short Read Archive unter der Studienzugangsnummer: SRP021903 hinterlegt. Genomassemblierungen zusammen mit Genmodellen und Zuordnungen sind auf www.jgi.doe.gov. (DOE Joint Genome Institute) unter der IMG Projekt-ID: 9992 einsehbar.

| FLX 454 (gefiltert) | | | |
|----------------------------------|-----------------|--|--|
| Anzahl | 569.233 | | |
| Gesamtlänge (bp) | 322.201.969 | | |
| durchschnittliche Länge (bp) | 566 | | |
| Bereich (bp) | 20 - 1.637 | | |
| GC Gehalt (%) | 54 | | |
| Illumina (gefiltert) | | | |
| Anzahl | 217.902.594 | | |
| Gesamtlänge (bp) | 21.136.551.618 | | |
| durchschnittliche Länge (bp) | 97 | | |
| Bereich (bp) | 97 | | |
| GC Gehalt (%) | 51 | | |
| Contigs - Assemblierung (velvet) | | | |
| Anzahl | 165.176 | | |
| Gesamtlänge (bp) | 164.776.921 | | |
| durchschnittliche Länge (bp) | 997 ± 2.780 | | |
| N50 (bp) | 2.410 | | |
| größter (bp) | 203.650 | | |
| GC Gehalt (%) | $52 \pm 10\%$ | | |

Tabelle 3.4: Übersicht zur Anzahl der Sequenzen und Contigs aus der FLX 454- und Illumina-Sequenzierung

Es konnten insgesamt 164,7 Mbp an assemblierten DNA-Sequenzen in Contigs von 165 bp bis 203.650 bp generiert werden. Die durchschnittliche Länge betrug 997 ± 2.780 bp, wobei 50% der assemblierten Contigs eine Länge von 2.410 bp besaßen.

3.3.1 Phylogenetische Einordnung der rRNA - Sequenzen

Aus der Analyse der assemblierten Genfragmente konnten 943 rRNA-Gensequenzen mit einer Größe von > 200 bp ermittelt werden. Insgesamt konnten die Ergebnisse aus dieser Analyse (Abbildung 3.10) weitestgehend die vorherigen Ergebnisse zur Diversität und Populationsstruktur des PBR-Biofilms bestätigen. Die Zuordnung der Sequenzen erfolgte durch die in der NCBI Datenbank hinterlegten Vergleichssequenzen der phylogenetischen Markergene der 16S- und 18S rRNA.



Abbildung 3.10: **A-C:** Zuordnung der 943 rRNA Gensequenzen aus dem Metagenom der mikrobiellen Gemeinschaft des PBR-Biofilms (T5). **B:** Zuordnung der 16S rRNA Gensequenzen, **C:** Zuordnung der 18S rRNA Gensequenzen.

27% der 16S rRNA Gene konnten den Bacteroidetes zugeordnet werden. In der analysierten Probe setzten sie sich aus den Ordnungen Cytophagales (4%), Sphingobacteriales (8%) und Flavobacteriales (15%) zusammen. Den Alphaproteobacteria wurden 20% der Sequenzen zugeordnet. Die 16S rRNA Genfragmente wurden zu den Ordnungen Rhodobacterales (6%), Rhizobiales (7%), Sphingomonadales (5%), Caulobacterales (2%) eingeordnet. 18% der 16S rRNA-Sequenzdaten wurden als Gammaproteobacteria (Pseudomonadales 10%, Chromatiales 5% und Xanthomonadales 3%) identifiziert. Darüber hinaus waren die Betaproteobacteria (Burkholderiales 14%, Rhodocyclales 1%) mit 15% der 16S rRNA Gensequenzen vertreten. Als Verrucomicrobiales und Planctomycetes konnten 2% und 1% der Genfragmente zugeordnet werden. Phylogenetische Gruppen unter <1% und Sequenzenfragmente, welche keiner taxonomischen Gruppe zugeordnet werden konnten, wurden unter "unkultivierbare und andere Bakterien" (8%) zusammengefasst. Mit 11% konnte ein beträchtlicher Anteil der 16S rRNA Sequenzdaten zum Reich der Eukaryota eingeordnet werden. Die ermittelten Sequenzdaten zeigten Homologien zu verschiedenen Chloroplasten und Mitochondrien. Neben diesen wurden auch verschiedene 18S rRNA Sequenzen (21%) identifiziert. Diese wurden hauptsächlich den Gattungen Scenedesmus

(34%), *Chlorella* (24%), *Spumella* (13%), *Nitzschia* (9%) und unbekannten Pilzen (9%) zugeordnet.

3.3.2 Analyse des metabolischen Potenzials der Mikroorganismen

Die Metagenomik ermöglicht es nicht nur detaillierte phylogenetische Aussagen über die bakteriellen Populationen eines Habitats zu treffen, sondern gibt gleichzeitig die Möglichkeit, potenzielle Stoffwechselleistungen aufzuzeigen.

Im Allgemeinen belegten die Analysen ein vielfältiges metabolisches und kataboles Potenzial der Mikroorganismen des PBR-Biofilms (Tabelle 3.5).

| funktionelle Zuordnung | % aller |
|--|-------------|
| | Zuordnungen |
| Aminosäurestoffwechsel | 16,6 |
| Polysaccharidabbau und Metabolismus | 16,1 |
| Energiestoffwechsel | 8,1 |
| Vitamin- und Cofaktor-Biosynthese | 6,7 |
| Sekundärmetabolit Synthese | 4,9 |
| Lipidmetabolismus | 4,8 |
| Transportmechanismen | 4,7 |
| Abbau von xenobiotischen und aromatischen Verbindungen | 4,2 |
| Exopolysaccharid Biosynthese und Modifikationen | 1,9 |
| Zellfortsätze und Motilität | 1,8 |
| Sekretionssysteme | 1,6 |
| Sonstiges | 14,2 |
| Gesamt | 100 |

Tabelle 3.5: Schlüsselfunktionen des bakteriellen Biofilm-Metagenoms

In der vorliegenden Sequenzanalyse konnten ca. 347.000 Protein-kodierende Gene zugeordnet werden. Insgesamt konnten 177.966 Gene zu Produktnamen aus der Pfam-Datenbank (Sonnhammer *et* al., 1997; Finn *et* al., 2008) identifiziert werden. 125.999 Gene entsprachen offenen Leserahmen (ORFs) und Genen aus der COG-Datenbank (Tatusov *et* al., 1997; 2001) und 95.663 ORFs konnten durch Sequenzhomologie zu Referenzen aus der KO-Datenbank

(Kanehisa *et* al., 2004) analysiert werden. Darüber hinaus zeigten 55.767 Gene Homologien zu Sequenzdaten der KEGG-Datenbank (Ogata *et* al., 1999; Nakaya *et* al., 2013). Über die Enzym-Datenbank (Bairoch, 2000) konnten 52.742 Gene und über die MetaCyc-Pathwayanalyse (Caspi *et* al., 2008) konnten 35.935 Protein-kodierende Gene zugeordnet werden. Ferner ist zu beachten, dass bis zu 1,5% aller ORFs und Gene der Metagenomanalyse aus eukaryotischer DNA stammten.

Metabolisches Potenzial zur Biofilmbildung

Die Sequenzanalyse der PBR-Metagenomfragmente zeigte verschiedene metabolische Merkmale, die in Zusammenhang zur bakteriellen Biofilmbildung standen (Tabelle 3.6). Hierzu gehörten Gene und ORFs, welche putativ für Sekretionssysteme (1,6%) und Zellfortsätze (1,8%) kodierten sowie Sequenzfragmente, welche in Verbindung zur Exopolysaccharid Biosynthese und Modifikationen (1,9%) standen. In Tabelle 3.6 sind die möglichen Genprodukte, deren Zuordnung und Anzahl zusammenfassend aufgeführt.

Tabelle 3.6: Anzahl der Gene und Genprodukte aus dem Algen-Bakterien-Metagenom, welche in Zusammenhang zur Biofilmbildung stehen.

| Umweltsignale / Genprodukte | Anzahl der Gene / Zuordnung |
|--|---|
| Zellfortsätze / Adhäsine | |
| Flagella, Pili | 397, T4-Pili |
| Signale | |
| Veränderung der Umweltbedingungen (natürliche Kompetenz, Stressantwort) | 233, Typ 4-Konjugations-Pili 11, com <i>EA</i> -Homologe |
| Quorum Signale (LuxI / LuxR System, acylierte Homoserinlactone (AHL), LuxP / LuxQ System, Interspezies Autoinducer (AI2), Peptide (AIP)) | > 10, AHL-Synthase |
| Sekundäre Botenstoffe und Proteine | |
| c-di-GMP (GGDEF und EAL Proteine) | 429, GGDEF-Domain Proteine |
| | 250, EAL-Domain Proteine |

Verschiedene Umweltsignale und Genprodukte sind wesentlich an der Biofilmbildung beteiligt. In dem PBR-Biofilm-Metagenom konnten 397 Gene identifiziert werden, welche für T4-Pili kodierten. Darüber hinaus zeigten verschiedene ORFs, Homologien zu Typ 4Konjugations-Pili und com*EA*-Homologe. Interessanterweise konnten nur ca. 10 Gene identifiziert werden, die Sequenzhomologien zu AHL-Synthasen zeigten. Jedoch konnten 429 ORFs GGDEF- und 250 Sequenzfragmente EAL Domain Proteine zugeordnet werden.

Katabolisches Potential der mikrobiellen Konsortien

Generell konnte ein überwiegender Anteil an Genen zu den klassischen Wegen des Abbaus von Polysacchariden, Proteinen und Cellulose (16,1%), aber auch zum Abbau von aromatischen Verbindungen (4,2%) identifiziert werden. So konnten für den Abbau von Biopolymeren 64 Amylasen und 57 Cellulasen identifiziert werden. 22 Gene standen in Assoziation zur Depolymerisation von Polyhydroxybuttersäure (PHB). Darüber hinaus konnte eine hohe Anzahl von Proteasen (2.419) ermittelt werden. Weiterhin konnten innerhalb des Metagenoms über 600 Mono-und Dioxygenasen identifiziert werden, welche unter anderem beim Abbau von aromatischen Verbindungen beteiligt sind (Gibson & Parales, 2000; Boyd *et* al., 2001).

Überraschenderweise konnte eine relativ große Anzahl von möglichen Genen bestimmt werden, welche im Lipid- und Fettsäurekatabolismus (4,8%) involviert waren. Insgesamt konnten 1.137 ORFs ermittelt werden, welche für esterolytische bzw. lipolytische Enzyme kodierten. Ferner ist es bemerkenswert, dass eine hohe Anzahl (> 600) von Fettsäure-Oxidoreduktasen und Oxidoreduktasen ohne spezifische Substratzuordnung innerhalb der PBR Metagenoms identifiziert werden konnten.

Hinsichtlich möglicher Autotrophie konnten insgesamt 45 Gene identifiziert werden, die für die große und die kleine Untereinheit der Ribulosebisphosphatcarboxylase/-oxygenase (RUBISCO) kodierten. Weitere detaillierte Analysen der Gene für die RUBISCO zeigten, dass sie bakteriellen Ursprungs waren (z. B. Rhizobiales und Burkholderiales) und nicht auf die Chloroplasten der Mikroalgen zurückzuführen waren. In diesem Rahmen ist es bemerkenswert, dass eventuell einige Mikroorganismen in der Lage waren, molekularen Wasserstoff und CO₂ als Energie- und Kohlenstoffquelle zu nutzen. Außerdem konnten Gene identifiziert werden, die für die kleinen und großen Untereinheiten von Ni²⁺ - und Fe²⁺ - abhängigen Hydrogenasen kodierten. Darüber hinaus konnten 100 Gene identifiziert werden, die für Kohlenmonoxid-Dehydrogenasen kodierten, die das Wachstum auf CO als Energiequelle ermöglichen (Meyer *et* al., 1986).

Auch konnte für die mikrobiellen Populationen innerhalb des PBR Biofilms eine fermentative Lebensweise zugeordnet werden. Es konnten 185 Gene identifiziert werden, welche für Ethanol-, Lactat-, Malat- oder Propionat-spezifische Dehydrogenasen kodierten.

Biosynthese von B-Vitamine

Die Interaktion zwischen Mikroalgen und Bakterien beschränkte sich jedoch nicht nur auf die bakterielle Verwertung der Exsudate der Algen als Kohlenstoff- und Energiequelle, sondern beinhaltete auch die bakterielle Synthese von Vitaminen und Cofaktoren (6,7%).

B-Vitamine katalysieren als Coenzyme viele wichtige biochemische Reaktionen im zentralen Stoffwechsel. Zu diesen Reaktionen gehören Umlagerung/Reduktion von C-C-Bindungen und Methyl-Transfer-Reaktionen, die Synthese von Desoxyribose, Fettsäuren, Kohlenhydrate, verzweigte Aminosäuren, der Elektronentransfer in Oxidations-Reduktions-Reaktionen, und die CO₂-Fixierung (King, 1980).

Die Analyse der Gene und ORFs im PBR Biofilm Metagenom zeigte, dass alle relevanten Gene für die Biosynthese von B12 vorhanden waren (Abbildung 3.11). Häufig lagen diese in mehreren Kopien vor. Es konnten insgesamt 533 Sequenzfragmente mit der Biosynthese von Vitamin B12 in Verbindung gebracht werden. Die Schlüsselenzyme CobS und CobV (EC: 2.7.8.26) konnten phylogenetisch den Ordnungen Burkholderiales, Flavobacteriales und Pseudomonadales zugeordnet werden.

Abbildung 3.11: Zuordnung der Gene aus dem Cobalamin Metabolismus. Auswertung von 533 Sequenzfragmenten des Metagenomdatensatzes.

Viele Algen sind ebenfalls auxotroph auf die Produktion von Thiamin und Biotin (Croft *et* al., 2006). Insgesamt konnten 384 Sequenzfragmente des Biofilm-Metagenoms zu den einzelnen Schritten der Thiamin-Biosynthese (Abbildung 3.12) zugeordnet werden (Jurgenson *et* al., 2009; Begley *et* al., 2012).

Abbildung 3.12: Zuordnung der Gene aus dem Thiamin Metabolismus. Auswertung von 384 Sequenzfragmenten des Metagenomdatensatzes.

Die phylogenetische Einordnung dieser Gene entsprach den Ordnungen von Pseudomonadales, Burkholderiales, Caulobacteriales, Rhizobiales, Sphingomonadales und unkultivierten Bakterien.

Innerhalb des Metagenoms wurden mehr als 180 Gene zu Biotin-abhängigen Carboxylasen zugeordnet. Insgesamt wurden 198 Gene der Synthese von Biotin zugeordnet. Hiervon konnten 38 Sequenzen mit Homologie zur Biotin-Synthase, die im letzten Schritt der Biotinbiosynthese als Schlüsselenzym dient, identifiziert werden. Außerdem konnten 27 Genfragmente als Dethiobiotinsynthase, die im vorletzten Schritt der Biosynthese beteiligt ist, eingeordnet werden. Für alle wichtigen Gene, die an der Biotinbiosynthese beteiligt sind, konnten mehrere Kopien nachgewiesen werden (Abbildung 3.13).

Abbildung 3.13: Zuordnung der Gene aus dem Biotin Metabolismus. Auswertung von 198 Sequenzfragmenten des Metagenomdatensatzes.

Die meisten dieser Gene konnten phylogenetisch zu den Ordnungen der Flavobacteriales, Cytophagales, Sphingomonadales, Caulobacterales und Xanthomonadales zugeordnet werden. Darüber hinaus wurden insgesamt 267 Gene für die Synthese von Riboflavin und 269 Gene für den Pyridoxin Metabolismus zugeordnet.

3.4 Funktions - basierte Analysen des Mikroalgen - Bakterien -Konsortiums der Photobioreaktoren

Sequenz-basierte Metagenomanalysen in Kombination mit Funktions-basierten Studien haben unser Wissen über die mikrobielle Gemeinschaften, die phylogenetische Zusammensetzung und das genetische Potential eines Habitats deutlich erhöht. Zum einen wurden in dieser Arbeit direkte Untersuchungen des Kulturüberstandes durchgeführt, zum anderem erfolgten Aktivitäts-basierte Analysen der konstruierten Metagenombank aus der Gesamt-DNA der Photobioreaktorprobe (2.7.1, 2.7.2).

3.4.1 Abbau und Verwertung von Mikroalgenexsudaten

Neben dem Interesse, das mikrobielle Leben in Ökosystemen zu verstehen, eröffnet die direkte Klonierung von DNA-Fragmenten die Möglichkeit, sich das genetische Potential aller Organismen eines Habitats nutzbar zu machen und somit nicht nur die Zusammensetzung mikrobieller Gemeinschaften sondern auch ihre phänotypischen Eigenschaften kultivierungsunabhängig aufzuklären (Steele & Streit, 2005).

Die isolierte Gesamt-DNA der Mikroalgen-Bakterien-Kultur wurde zunächst mit Hilfe des "Copy ControlTM Fosmid Library Production Kits" erfolgreich in Fosmid-Vektoren kloniert. Anschließend konnten die Vektoren *in vitro* in λ -Phagen Köpfe verpackt und in den *E. coli*-Stamm Epi300 transduziert werden (2.6.7.2). Insgesamt wurde eine 14.976 Klone umfassende Fosmid-Metagenombank konstruiert. Zur Analyse der Qualität und der Insertgröße wurden die Fosmide aus 20 verschiedenen Klonen, nach fünf stündiger Induktion isoliert (2.6.4.3) und durch einen analytischen Restriktionsverdau mit BamHI auf die Größe des Inserts geprüft (2.6.6.1). Der verwendete Vektor pCC1FOS wurde von BamHI an den beiden Enden der Multiple Cloning Site geschnitten (Position: 353, 365). Der linearisierte Vektor hatte eine Größe von 8139 bp. Die durchschnittliche Insertgröße lag bei 30.000 - 35.000 bp. Dies entspricht etwa 524 Mbp an klonierter DNA. Ein Großteil der Bakterienarten besaßen Genome mit einer Größe von 3 - 8 Mbp, daher kann davon ausgegangen werden, dass das hier untersuchte Metagenom der Biofilmprobe mit ca. 30 verschiedenen Bakterienarten etwa eine Gesamtgröße von 90 Mbp bis 240 Mbp besaß.

Verschiedene Testverfahren sollten Einblicke in die funktionellen Eigenschaften der in den Photobioreaktoren vorkommenden Mikroorganismen geben.

Untersuchungen zur cellulolytischen Aktivität (CMC-Agarplattentest)

Die cellulolytische Aktivität der in der Metagenombank des Photobioreaktors erfassten Mikroorganismen wurde mittels eines kolorimetrischen Verfahrens überprüft (2.7.1). Kasana *et* al. (2008) nutzten zur Bestimmung von cellulolytischen Aktivität die Anfärbung mit Gram's Jod. Dieses bildet einen blauschwarzen Komplex mit Cellulose, nicht aber mit Dextrinen. Das Resultat wäre eine scharfe, deutlich sichtbare helle Zone um die cellulaseproduzierenden Kolonien innerhalb von drei bis fünf Minuten.

Abbildung 3.14: CMC-Agarplattentest; A: 48 Klone der Mikrotiterplatte Algen 44 nach dem Anfärben mit Gram's Jod. Die Klone Algen 44_D7 und G9 hinterließen einen deutlich erkennbaren orangefarbenden Hof und wurden entsprechend als putativ positiv vermerkt. B: Positivkontrolle: ELE 179_F2

Es wurden die Mikrotiterplatten Algen_1 bis Algen_156 getestet. Insgesamt wurden 14.976 Klone auf ihre cellulolytische Aktivität hin untersucht. Es konnten vier vermeintlich positive

Klone identifiziert werden, welche Cellulase Aktivität zeigten. Abbildung 3.14 zeigt die vermutlich positiven Klone der Mikrotiterplatte Algen 44_D7 und G9 welche durch einen orange gefärbten Hof erkennbar waren. Als Positivkontrolle diente ein Cellulase positiv getesteter Fosmidklon der Elefantenkot-Bank (ELE 179_F2). Als Negativkontrolle diente der Fosmidklon Algen_156_A1 (ohne cellulolytische Aktivität).

| Mikrotiterplatte | Position | phylogenetische Zuordnung |
|------------------|----------|------------------------------------|
| Algen 44 | D7 | Cellvibrio japonicus Ueda107 (79%) |
| Algen 44 | G9 | Pedobacter glucosidilyticus (99%) |
| Algen 44 | E1 | Fluviicola taffensis RW262 (84%) |
| Algen 60 | H12 | <i>Runella</i> sp. (98%) |

Tabelle 3.7: Fosmid-Klone mit putativ cellulolytischer Aktivität

Insgesamt konnten vier putativ positive Klone identifiziert werden, welche Cellulase-Aktivität zeigten; diese sind in Tabelle 3.7 aufgeführt. Die phylogenetische Zuordnung der klonierten DNA-Fragmente erfolgte durch Ansequenzierung der Fosmide (Primer: pcc1FOS_R). Die generierten ca. 600 - 800 bp großen Sequenzabschnitte wurden mit den in der NCBI-Datenbank (blastn) hinterlegten Sequenzen verglichen. Die klonierten DNA-Fragmente der Fosmidklone 44_G9, 44_A12 und 44_E1 konnten zu dem Phylum der Bacteroidetes (*Pedobacter glucosidilyticus* 99%, *Runella* sp. 98% und *Fluviicola taffensis* RW262 84%) zugeordnet werden. Die Insert-DNA des Fosmidklons 44_D7 stammte mit einer Übereinstimmung von 79% aus *Cellvibrio japonicus*, einem Gammaproteobacteria.

Untersuchungen zur hydrolytischen und lipolytischen Aktivität

Durch den Tributyrin-Plattentest wurden die Klone der Mikroalgen-Bakterien-Metagenombank (14.976) auf Esterase-/Lipase - Aktivität untersucht (2.7.2). Als Positivkontrolle diente der COS6B1 Subklon AF7, ein in pTZ19R ligiertes und in *E.coli* DH5α kloniertes Lipase-Gen. Als Negativkontrolle diente der Fosmidklon Algen_156_A1 (ohne lipolytische Aktivität).

Durch die hydrolytische Spaltung des Tributyrins in Glycerin und Buttersäure entstand um putativ positive Kolonien ein klarer Hof. Eines der Ergebnisse ist exemplarisch in Abbildung 3.15 dargestellt. Es zeigt den Klon Algen 103_F12, welcher durch einen klaren Hof gekennzeichnet war. Insgesamt konnten 68 vermeintlich positive Klone in dieser ersten Analyse identifiziert werden.

Abbildung 3.15: Tributyrin-Plattentest. A: 48 Klone der Mikrotiterplatte Algen 103 gestempelt auf eine TBT-Agarplatte nach fünftägiger Inkubation bei 37 °C. Um die Kolonie des Klons Algen 103_F12 entstand ein deutlich sichtbarer klarer Hof. B: Positivkontrolle.

Zur weiteren Differenzierung bot sich der *p*NP-Test an, welcher es ermöglicht zwischen Esterasen und Lipasen zu unterscheiden. *Para*-Nitrophenylester sind chromogene Substrate, aus denen nach Hydrolyse das gelbe *p*-Nitrophenol abgespalten wird. Dieses kann mit einem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von OD_{405} nm quantitativ bestimmt werden. *Para*-Nitrophenylester (*p*NP), die unterschiedlich lange Fettsäurereste tragen, dienen dem Nachweis von Carboxylesterasen, wobei ab einer Kettenlänge von 10 oder mehr Kohlenstoffatomen nur noch Lipasen die Reaktion katalysieren können (Jaeger *et* al., 1999).

Tests mit Zellrohextrakten von 16 Fosmidklonen bestätigten, dass eine breite Palette von Fettsäuren mit unterschiedlicher Kettenlänge verstoffwechselt wurde (Abbildung 3.16).

Abbildung 3.16: *p*NP-Test der Zellrohextrakte verschiedener Fosmidklone mit unterschiedlichen *p*NP-Substraten (*p*NP-laurate, -myristate, -palmitate, -stearate). Die Daten entsprechen den Mittelwerten von mindestens drei Wiederholungen.

Für alle getesteten Fosmidklone konnte eine Enzymaktivität auf pNP-laurate (C12) nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde für drei Klone (73_A2, 108_D6 und 131_A4) ebenfalls eine Hydrolyse von pNP-palmitate (C16) und pNP-steratate (C18) dokumentiert. Die Positionsbeschreibung und die phylogenetische Zuordnungen sind in Tabelle 3.8 zusammenfassend aufgeführt.

| Mikrotiterplatte | Position | phylogenetische Zuordnung |
|------------------|----------|---|
| Algen 63 | B8 | n.b. |
| Algen 67 | В5 | Sphingomonas wittichii RW1 (87%) |
| Algen 73 | A2 | uncultured Sphingomonadales (81%) |
| Algen 73 | A6 | n.b. |
| Algen 76 | C2 | Acidovorax facilis strain FC-208 (99%) |
| Algen 78 | A6 | n.b. |
| Algen 78 | B12 | Cellvibrio japonicus Ueda107 (81%) |
| Algen 79 | D6 | n.b. |
| Algen 80 | E10 | Acidovorax sp. KKS102 (89%) |
| Algen 84 | F5 | Sphingopyxis alaskensis RB2256 (80%) |
| Algen 103 | F12 | Variovorax paradoxus S110 (83%) |
| Algen 107 | F7 | n.b. |
| Algen 108 | D6 | Flavobacterium branchiophilum FL-15 (76%) |
| Algen 121 | E11 | n.b. |
| Algen 124 | D8 | Flavobacterium johnsoniae UW101 (86%) |
| Algen 131 | A4 | uncultured Rhizobiales (81%) |

Tabelle 3.8: Fosmid-Klone mit putativ hydrolytischer / lipolytischer Aktivität

Die phylogenetische Zuordnung ergab sich aus der Teilsequenzierung der einzelnen Fosmidklone (Primer: pcc1FOS_R). Die generierten Sequenzabschnitte (600-800 bp) wurden mit den in der NCBI-Datenbank (blastn) hinterlegten Sequenzen verglichen. Die Insert-DNA der Klone 67_B5 (*Sphingomonas wittichii*, 87%), 73_A2 (uncultured Sphingomonadales, 81%) und 84_F5 (*Sphingopyxis alaskensis* RB2256, 80%) konnten den Sphingomonadales (Alphaproteobacteria) zugeordnet werden. Die Sequenz von Klon 131_A4 wurde mit einer Homologieübereinstimmung von 91% zu den Rhizobiales (Alphaproteobacteria) zugeordnet.

Die DNA-Fragmente der Klone 76_C2 (*Acidovorax facilis*, 99%), 80_E10 (*Acidovorax* sp., 89%) und 103_ F12 (*Variovorax paradoxus*, 83%) wurden zu den Burkholderiales (Betaproteobacteria) eingeordnet. Weiterhin konnte mit 81%iger Übereinstimmung zu *Cellvibrio japonicas* (78_B12) ein Gamma-Proteobactria identifiziert werden. Zu dem Phylum der Bacteroidetes wurden die DNA-Fragmente der Fosmidklone 108_ D6 (*Flavobacterium branchiophilum*, 76%) und 124_ D8 (*Flavobacterium johnsoniae*, 96%) zugeordnet. Darüber hinaus konnte die Insert-DNA von fünf Fosmidklonen (63_B8, 73_A6, 78_A6, 107_F7, 121_E11) keiner bisher bekannten Bakteriengruppe zugeordnet werden.

Zusätzliche kultivierungsabhängige Untersuchungen mit zellfreien Überständen direkt aus der wachsenden Mikroalgenkultur unterstützten die Ergebnisse aus dem Metagenomansatz (Abbildung 3.17).

Abbildung 3.17: *p*NP-Test des zellfreien Kulturüberstandes mit unterschiedlichen *p*NP-Substraten (*p*NP-acetate, -butyrate, -octanoate, -decanoate, -laurate, -myristate, -palmitate, -stearate). Die Daten entsprechen den Mittelwerten von mindestens drei Wiederholungen. Die Fehlerindikatoren zeigen eine einfache Standardabweichung.

Bei diesen Versuchen konnte eine deutlich geringere aber signifikante hydrolytische Aktivität in den zellfreien Kulturüberständen des PBRs dokumentiert werden. Es wurden Enzymaktivitäten im Überstand von 0,0732 mU/ml für pNP-octanoate (C8), 0,2807 mU/ml für pNP-decanoate (C10), 0,3373 mU/ml für pNP-laurate (C12) und 0,1106 mU/ml für pNPmyristate (C14) ermittelt. Bezüglich der hydrolytische Spaltung von pNP-acetate (C2), -butyrate (C4), -palmitate (C16) und -stearate (C18) konnten keine nennenswerten Aktivitäten nachgewiesen werden.

3.4.2 Nachweis von B-Vitaminen

Die Metagenomanalyse ergab, dass 6,7% aller Protein-kodierenden Gene in den Stoffwechsel zur Biosynthese von Cofaktoren und Vitaminen involviert waren (Tabelle 3.5).

Zusätzliche Tests in einem experimentellen Laborreaktor bestätigten, dass nano- bzw. picomolare Mengen der Vitamine Cobalamin und Biotin bereits 48 Stunden nach der Inokulation im Kulturüberstand des PBRs nachgewiesen werden konnten (Abbildung 3.18 und 3.19). Insgesamt wurde der Gehalt der beiden Vitamine im Überstand der Mikroalgen-Bakterien-Kultur über einen Zeitraum von acht Tagen analysiert.

Abbildung 3.18: Gehalt an Cobalamin (ng/ml). Der Cobalamingehalt (aktive und inaktive Form) des Algenkulturüberstandes wurde zu verschiedenen Zeitpunkten während des Algenwachstums bestimmt. Die Daten entsprechen den Mittelwerten von mindestens drei Wiederholungen. Die Fehlerindikatoren zeigen eine einfache Standardabweichung.

Die Messwerte für die inaktive Form von Cobalamin waren mit 0,089 - 0,158 ng/ml relativ stabil. Hingegen schwanken die Daten zur aktiven Form des Cobalamins zwischen 0,049 - 0,262 ng/ml. Vier Tage nach der Inokulation des Laborreaktors konnte der Beginn der

exponentiellen Wachstumsphase der Algenkultur dokumentiert werden. In diesem Zeitraum war auch die höchste Konzentration an aktiven Vitamin B12 zu beobachten.

Abbildung 3.19: Gehalt an Biotin (ng/ml). Die Konzentration an Biotin wurde zu verschiedenen Wachstumsphasen der Mikroalgenkultur bestimmt. Die Daten entsprechen den Mittelwerten von mindestens drei Wiederholungen. Die Fehlerindikatoren zeigen eine einfache Standardabweichung.

Der Biotingehalt lag zwischen 7,38 - 15,40 ng/ml. Auch hier konnte eine Korrelation zwischen Anstieg des Vitamingehaltes und der beginnenden exponentielle Wachstumsphase der Mikroalgenkultur beobachtet werden.

3.5 Strategien zur Inhibierung von mikrobiellen Biofilmen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden nicht nur die funktionellen und phylogenetischen Charakteristika der PBR-Kultur analysiert. In Anbetracht der Tatsache, dass die Biofilmbildung die Kultivierung der Mikroalgen negativ beeinflusste, wurde auch ein Hauptaugenmerk auf die Minimierung bzw. Inhibierung von mikrobiellen Biofilmen gelegt.

Hierzu wurden zwei Funktions-basierte Screeningmethoden angewandt. Sie beruhten auf der Interaktion zwischen den Testorganismen und den sezernierten Substanzen bzw. der direkten Wirkung von Zellrohextrakten einzelner Fosmidklone aus der Elbsediment-Metagenombank (Standort: Teufelsbrück). Eine Untersuchungsmethode wurde durch das "*Pseudomonas* PA01 Überschichtungsassay" (2.7.3.1) repräsentiert, dessen Ergebnisse in Abbildung 3.20 dargestellt sind. Eine weitere Methode der Biofilmdesintegrationsassay ist in 2.5.3 und 2.7.3.2 beschrieben. Die Ergebnisse sind unter 3.5.2 aufgeführt.

Putativ positive Fosmidklone mit biofilminhibierender bzw. wachstumsinhibierender Wirkung wurden mehrfach auf ihre Aktivität hin getestet und anschließend molekularbiologisch untersucht (2.6.8, 3.5.3).

3.5.1 Pseudomanas aeruginosa PA01-Überschichtungsassay

Das Prinzip beruht hierbei auf der Diffusion von Sekundärmetaboliten durch die LB-Agarschicht, wodurch Wechselwirkungen der ausgeschiedenen Substanzen der Fosmidklone mit dem Testorganismus durch einen unbewachsenen Hof sichtbar wurden (Abbildung 3.20).

Insgesamt wurden 10.080 Fosmidklone der Elbsediment-Metagenombank von Teufelsbrück mittels des Überschichtungsassay getestet. Hierzu wurden die Metagenomklone auf eine LB-Agarplatte gestempelt und für 72 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach Lyse der gewachsenen Kolonien wurden die Platten mit einem dünnen Film LB-Agar überschichtet und der Testorganismus ausplattiert; es erfolgte eine erneute Inkubation bei 37 °C. Metagenomklone, die einen Hemmhof ausbildeten und somit *Pseudomonas aeruginosa* PA01 in seinem Wachstum inhibierten, wurden als positiv vermerkt.

Abbildung 3.20: Überschichtungsassay der Elbsediment-Metagenombank von Teufelsbrück. Fosmidklone mit einer putativen biofilminhibierenden oder wachstumsinhibierenden Wirkung sind durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die gestrichelten Pfeile deuten auf die *Pseudomonas aeruginosa* PA01- Kolonien.

Mittels dieser Methode konnten 64 Fosmidklone identifiziert werden, dessen Genprodukte eine putativ hemmende Wirkung auf das Wachstum bzw. der Biofilmbildung des Testorganismus besaßen. Durch ein weiteres funktionelles Screening im Mikrotitermaßstab wurde die Wirkung der Zellrohextrakte dieser Klone auch auf *Staphylococcus epidermidis* 1457 untersucht.

3.5.2 Biofilminhibierungsassay im Mikrotitermaßstab

Dieser Test beruhte ebenfalls auf die Wechselwirkung zwischen den Testorganismen und der Synthese von biofilminhibierenden oder wachstumsinhibierenden Substanzen.

Die Fosmidklone wurden hierzu über Nacht angezogen und mittels Ultraschall lysiert (2.7.3.2), mit den Testorganismen versetzt und in 96er Mikrotiterplatten stehend inkubiert. Die Auswertung erfolgte optisch nach Anfärben der Mikrotiterplatten (2.5.3). Durch die Verwendung von Zellrohextrakten wurde die Wirkung des gesamten Zellinhaltes der verwendeten Fosmidklone untersucht. Von den 64 getesteten Fosmidklonen bewirkte der Zellrohextrakt von zehn Klonen eine Verminderung des Wachstums und/oder der Biofilmbildung sowohl auf *Staphylococcus epidermidis* 1457 (Gram-positiv, Abbildung 3.21) als auch auf *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Gram-negativ, Abbildung 3.22).

Abbildung 3.21: Lupenaufnahme einzelner Wells der 96er-Mikrotierplatten (Zeiss, AxioVision, Vergrößerung x 0,8). Biofilmbildung von *Staphylococcus epidermidis* 1457 bei Zugabe von 150 µl Zellrohextrakt aus den Fosmiden der Teufelsbrück-Metagenombank. Die Mikrotiterplatten wurden über einen Zeitraum von 48 h bei 37°C stehend inkubiert und anschließend mit 5% Kristalviolettlösung gefärbt. A: Kontrolle der Biofilmbildung von *Staphylococcus epidermidis* 1457 bei Zugabe von 150 µl Phosphatpuffer (pH: 7,2), B: Biofilmbildung von *Staphylococcus epidermidis* 1457 bei Zugabe von 150 µl Zellrohextrakt des Fosmides TB_1_A1 (ohne inhibierende Wirkung), F1: Fosmidklon TB 19_C4, F2: Fosmidklon TB 49_D12, F3: Fosmidklon TB 59_F9, F4: Fosmidklon TB 60_F8, F5: Fosmidklon TB 61_F10, F6: Fosmidklon TB 64_D10, F7: Fosmidklon TB 64_E4, F8: Fosmidklon TB 87_D9, F9: Fosmidklon TB 90_E10, F10: Fosmidklon TB 103_E4.

Abbildung 3.22: Lupenaufnahme einzelner Wells der 96er-Mikrotierplatten (Zeiss, AxioVision, Vergrößerung x 0,8). Biofilmbildung von *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 bei Zugabe von 150 µl Zellrohextrakt (Gesamtprotein) aus den Fosmiden der Teufelsbrück-Metagenombank. Die Mikrotiterplatten wurden über einen Zeitraum von 24 h bei 37°C stehend inkubiert und anschließend mit 5 % Kristalviolettlösung gefärbt. **A:** Kontrolle der Biofilmbildung von *Pseudomonas aeruginosa* PAO14 bei Zugabe von 150 µl Phosphatpuffer (pH: 7,2), **B:** Biofilmbildung von *Pseudomonas aeruginosa* PAO14 bei Zugabe von 150 µl Phosphatpuffer (pH: 7,2), **B:** Biofilmbildung von *Pseudomonas aeruginosa* aeruginosa PAO14 bei Zugabe von 150 µl Zellrohextrakt des Fosmides TB_1_A1 (ohne inhibierende Wirkung), **F1:** Fosmidklon TB 19_C4, **F2:** Fosmidklon TB 49_D12, **F3:** Fosmidklon TB 59_F9, **F4:** Fosmidklon TB 60_F8, **F5:** Fosmidklon TB 61_F10, **F6:** Fosmidklon TB 64_D10, **F7:** Fosmidklon TB 64_E4, **F8:** Fosmidklon TB 87_D9, **F9:** Fosmidklon TB 90_E10, **F10:** Fosmidklon TB 103_E4.

Fosmide, die in beiden Untersuchungen (3.5.1, 3.5.2) biofilminhibierende Resultate zeigten, wurden durch eine Sequenzierung der Insert-DNA näher analysiert.

3.5.3 Sequenzanalyse der Fosmide mit putativ biofilminhibierenden Genprodukten aus der Elbsediment-Metagenombank von Teufelsbrück

Fosmidklone, welche sowohl im Überschichtungsassay als auch in den verschiedenen Biofilminhibierungsassays im Mikrotitermaßstab Einschränkungen in der Ausbildung von Biofilmen zeigten, wurden für nähere Untersuchungen herangezogen.

Die Fosmide der jeweiligen Klone wurden mit dem "PureLinkTM Quick Plasmid Miniprep Kit" (invitrogen, Löhne, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mittels "HiSeq2000 von Illumina" sequenziert. Hierzu wurden jeweils 500 ng Fosmid-DNA in den Laboratorien der Christian-Alberts-Universität Kiel sequenziert und am Heinrich-Pette-Institut (Hamburg) mit dem Softwareprogramm "metavelvet" (Zerbino & Birney, 2008) assembliert. Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte durch die in der NCBI-Datenbank hinterlegten Vergleichssequenzen sowie durch die Softwareprogramme FinchTV, BioEdit und Clonemanager. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.9 aufgeführt.

| Fosmidklon | Gesamt- länge [bp] | Anzahl der offenen Lese- rahmen (ORF´s) | konser- vierte Domänen | Phylogenetische Zuordnung |
|------------|-----------------------|---|------------------------------|--------------------------------|
| TB 19_C4 | 34589 | 148 | 14 | unk. Planctomycetia (85%) |
| TB 49_D12 | 6226 | 33 | 3 | unk. Burkholderia (73%) |
| TB 59_F9 | 40525 | 153 | 29 | unk. Nitrospirae (91%) |
| TB 60_F8 | 31693 | 66 | 6 | unk. Sphingobacteria (100%) |
| TB 61_F10 | 33933 | 89 | 26 | Sinorhizobium meliloti (79%) |
| TB 64_D10 | 29695 | 139 | 51 | Ralstonia sp. (77%) |
| TB 64_E4 | 12909 | 44 | 11 | unk. Sphingobacteria (100%) |
| TB 87_D9 | 33512 | 176 | 35 | Planctomyces limnophilus (84%) |
| TB 90_E10 | 42861 | 147 | 71 | Pseudomonas putida (86%) |
| TB 103_E4 | 22392 | 73 | 49 | unk. Gammaproteobacteria (88%) |

Tabelle 3.9: Übersicht zur Gesamtsequenzierung der Insert-DNA der putativ biofilminhibierenden Genprodukte der Fosmide aus der Elbsediment-Metagenombank von Teufelsbrück

Durch die Gesamtsequenzierung und Assemblierung konnten die Insertsequenzen der Fosmide konstruiert werden.

Die Insert-Sequenz des Fosmides TB 19_C4 konnte mit einer Gesamtlänge von ca. 34 kb und 148 offenen Leserahmen unkultivierten Planctomycetia (85%) zugeordnet werden. Die Insert-DNA von TB 49_D12 weiste eine Gesamtlänge von 6226 bp und 33 ORF's auf und wurde mittels NCBI-blastn unkultivierten Burkholderia (73%) zugeordnet. Die Analyse von TB 59_F9 ergab eine Länge von ca. 40 kb und 153 ORF's und konnte phylogenetisch zu Nitrospirae (91%) eingeordnet werden. Die Insert-DNA von Fosmid TB 60_F8 (31693 bp und 66 ORF's) und TB 64_E4 (12909 bp mit 44 offenen Leserahmen) konnte jeweils unkultivierten Sphingobacteria (100%) zugeordnet werden. Die Sequenz des Fosmides TB 61_F10 mit einer Gesamtlänge von ca. 33 kb, welche 89 ORF's repräsentierten, zeigte Homologien zu *Sinorhizobium meliloti* (79%). Die Sequenzanalyse zu Fosmid TB 64_D10 zeigte eine Gesamtlänge von 29695 bp mit 139 ORF's und wurde durch die bei NCBI-blastn hinterlegten Vergleichssequenzen zu *Ralstonia* sp. (77%) zugeordnet. Die Insert-DNA von TB 87_D9 (33512 bp mit 176 offenen Leserahmen) zeigte Sequenzhomologien zu *Planctomyces limnophilus* (84%). TB 90_E10, mit einer Gesamtsequenzlänge von 42861 bp mit 147 ORF's, konnte zu *Pseudomonas putida* (86%) eingeordnet werden. Die Analyse von TB 103_E4 (22392 bp und 73 ORF's) ergab eine phylogenetische Übereinstimmung von 88% zu unkultivierten Gammaproteobacteria.

Die Analysen zur Insert-DNA der Fosmide ergab, dass die konservierten Domänen unter anderem für EPS-modifizierende Enzyme kodierten. Erste Software-gestützte Auswertungen der einzelnen ORF's zeigten Sequenzhomologien zu unterschiedlichen Esterasen (TB 19_C4, TB 90_E10), Peptidasen (TB 49_D12, TB 59_F9, TB 64_D10, TB 64_E4, TB 87_D9, TB 103_E4), Proteasen (TB 60_F8) und bisher nicht weiter beschriebene Hydrolasen (TB 60_F8, TB 61_F10, TB 87_D9). Darüber hinaus standen einige mögliche Genprodukte der ORF's in Zusammenhang mit der Inhibierung der Zell-Zell-Kommunikation (TB 19_C4, TB 59_F9) und toxischen Genprodukten (TB 59_F9, TB 87_D9). Die geringen prozentualen Übereinstimmungen (28 – 59%) zu bereits bekannten Genprodukten und die hohe Anzahl an hypothetischen Gensequenzen lassen ein hohes Potential von mikrobiellen Genprodukten zur Biofilminhibierung vermuten.

4 Diskussion

In industriellen Verfahrenstechnologien stellt die mikrobielle Biofilmbildung in wässrigen Systemen eine entscheidende Herausforderung für die Produktivität und biotechnologische Nutzung der Anlagen dar. Die Fragen "Wie ist die mikrobielle und biochemische Zusammensetzung?" und "Welches metabolische Potential besitzen die Mikroorganismen?" bleiben allerdings häufig unbeantwortet. Insbesondere für die weitere Entwicklung der Mikroalgenbiotechnologie ist die Beantwortung dieser Fragen essentiell.

4.1 Mikrobiologische und chemische Analysen des Mikroalgen und Bakterien Biofilms

Für eine detaillierte Betrachtung der Morphologie sowie der Oberflächenstruktur der Zellen aus den Photobioreaktorproben wurden diese mittels fluoreszenz- und rasterelektronenmikroskopischer Verfahren untersucht. Aufgrund der sensiblen Beschaffenheit der Mikroorganismen der verwendeten Algen-Bakterien-Kultur ist bei beiden Methoden die Fixierung der Zellen ein entscheidender und kritischer Schritt in der Präparation der Proben, um nicht nur Zell-fragmente, sondern ganze Zellen betrachten zu können.

Durch die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) konnte eine phylogenetische Zuordnung der vorhandenen Mikroorganismen in die Domänen der Bacteria getroffen werden. Entscheidend bei der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung ist die Bindung der Sonden an die Zielregion der Mikroorganismen. Mit Hilfe der entsprechenden Eubakterien-Sonde (EUB 338I) wurde gezeigt, dass die vorhandenen Stäbchen und Kokken den Bakterien zuzuordnen sind, während für die Domäne der Archaeen (Arch 915) kein Sondensignal gezeigt werden konnte. Die dominierenden Zellformen waren Stäbchen und Kokken verschiedener Größe und Form. Alle Kulturproben wurden mittels DAPI-Färbung positiv auf das Vorhandensein von Mikroorganismen überprüft. Als ein charakteristischer Zelltyp verschiedener mikroskopisch untersuchter Proben konnten Stäbchen unterschiedlicher Morphologie detektiert werden.

Eine genauere Betrachtung der Morphologie sowie der Oberflächenstruktur der Zellen konnte durch rasterelektronenmikroskopische Analysen (REM) ermittelt werden. Die morphologischen Unterschiede zeigen verschiedene Formationen von Kokken und Stäbchen. Die Ergebnisse aus den FISH- und REM-Analysen legen eine gegenseitige Beziehung und einen möglichen Stoffaustausch zwischen Mikroalgen und Bakterien nahe, nicht nur durch die Abgabe von spezifischen Substanzen in das Medium, sondern auch direkt durch die Ausbildung von Haftorganen. Darüber hinaus ist die Ausbildung eines Geflechts von Mikroalgen und Bakterien durch extrapolymere Substanzen signifikant. Hierzu ist allerdings anzumerken, dass ca. 99% aller Mikroorganismen in Biofilmen wie Flocken oder Schleimschichten leben. Sie sind dabei in einer stark hydratisierten, gelartigen Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eingebettet (Donlan & Costerton, 2002). Die in dieser Arbeit untersuchte Biofilmmatrix bestand vorwiegend aus Lipiden, neutralen und sauren Polysacchariden, Proteinen sowie Uronsäuren. Der Gehalt an DNA lag unter 4 ng.

In der Literatur werden verschiedene Methoden zur Isolierung von EPS aus unterschiedlichen Habitaten beschrieben. Hierzu zählen die Dowex-Methode (Jahn & Nielsen, 1995), die Kronenether-Methode (Späth & Wuertz, 2000), die Isolierung mittels Formaldehyd bzw. Formaldehyd/NaOH (Liu & Fang, 2002) sowie die Isolierung mittels Zentrifugation (Kennedy & Sutherland, 1987; Troch *et* al., 1992). Es existiert zurzeit allerdings keine universelle Isolierungsmethode, um die EPS quantitativ von den Mikroorganismen abzutrennen (Nielsen & Jahn, 1999). Eine optimale Isolierungsmethode beinhaltet neben einer maximalen Ausbeute an EPS auch die Vermeidung der Lysis von Mikroorganismen oder die Zerstörung der Makromoleküle (Gehr & Henry, 1983).

Die Isolierung der EPS aus dem Algen-Bakterien-Biofilm erfolgte durch Homogenisierung der Biofilmsuspension in NaCl-Lösung und der darauf folgenden Zentrifugation zur Abtrennung der EPS von den Zellen. Durch die anschließenden Membranfiltrationen wurden verbleibende Mikroorganismen im Überstand entfernt.

Für die Bestimmung der quantitativen Zusammensetzung der EPS ist ebenfalls die Auswahl geeigneter Assays erforderlich. Hierbei war die Störanfälligkeit der Assays durch andere EPS-Bestandteile besonders zu berücksichtigen.

Ein weiterer Aspekt besteht darin, dass die EPS Bestandteile aus Proteinen, Uronsäuren sowie die neutralen und sauren Polysaccharide über photometrische Assays bestimmt werden. So kann die Konzentration an Polysacchariden nicht direkt ermittelt werden, sondern über Reaktionen ihrer Monosaccharide. In dieser Arbeit wurde die Phenol-Schwefelsäure-Methode nach Dubois *et* al. (1956) verwendet. Durch die Zugabe der Phenol-Lösung und der Schwefelsäure werden die Polysaccharide hydrolysiert. Die auftretende Farbreaktion wurde photometrisch bei OD_{480nm} für saure Polysaccharide (z. B. Alginat) und bei OD_{490nm} für neutrale Polysaccharide (z. B. Dextran) gemessen. Die Uronsäuren sind eine Teilmenge der Kohlenhydrate und können ebenfalls über eine Farbreaktion photometrisch bestimmt werden. In dieser Arbeit kam der Sulfamat-Biphenyl-Assay (Filisetti-Cozzi & Carpita, 1991) aufgrund seiner hohen Spezifität für Uronsäuren und der geringeren Störanfälligkeit zur Anwendung.

Zur Quantifizierung von Proteinen in der EPS werden generell drei Methoden eingesetzt: Die Protein-Bestimmung nach Lowry et al. (1951), die Bicinchoninsäure- (BCA) Methode (Smith et al., 1985) und die Farbstoffbindungs-Methode nach Bradford (1976). Der Lowry- und der BCA-Assay beruhen auf der Biuret-Reaktion von Peptidbindungen mit Cu²⁺-Ionen. Der BCAreduzierenden Zuckern. daher auch mit führen Kohlenhydrate Assay reagiert (Monosaccharide und reduzierende Enden von Polysacchariden) zu Störungen im BCA-Assay. Beim Farbstoffbindungs-Assay nach Bradford sind keine Kupfer-Ionen involviert. Durch Komplexbildung des Farbstoffs Coomassie Brilliantblau wird im sauren Milieu dessen Absorptionsmaximum von 465 nm zu 595 nm verschoben. Allerdings wird der Gehalt an Proteinen in den EPS von Reinkulturbiofilmen und Belebtschlämmen durch diese Methode deutlich unterschätzt (Frølund et al., 1996; Wingender et al., 2001), da viele Proteine im sauren Milieu ausfallen. Für die Bestimmung des Proteingehaltes wurde daher eine modifizierte Methode nach Lowry verwendet (Lowry et al., 1951), da sie am wenigsten von anderen EPS-Komponenten beeinflusst wurde und in der EPS-Analytik am weitesten verbreitet ist.

Der Lipidgehalt wurde durch Extraktion mit lipophilen Lösungsmitteln wie n-Hexan bestimmt (Hara & Radin, 1978). Da die Algen eine erhebliche Mengen an Lipiden produzieren und ins Medium freisetzen können, ist es nicht überraschend, dass die EPS weitgehend aus Fettsäuren bestand. Lipopolysaccharide und extrazelluläre Lipide können darüber hinaus entscheidend für die Haftung von Bakterien an Oberflächen sein (Conrad *et* al., 2003; Sand & Gehrke, 2006).

Innerhalb der Matrix sind alle Komponenten der lysierten Zellen verfügbar. Generell bestehen die EPS von Mikroorganismen aus Polysacchariden und Proteinen, es wurden aber auch Lipide und Nukleinsäuren nachgewiesen (Sutherland, 1988; Nielsen *et* al., 1997; Whitchurch *et* al., 2002). DNA wird häufig in Zusammenhang mit horizontalem Gentransfer erwähnt (Flemming & Wingender, 2010). Der DNA-Gehalt wurde nach Extraktion durch photometrische Messung bestimmt. Der geringe Gehalt spricht hier vermutlich für die Aktivität von DNasen. Den Polysacchariden wird hauptsächlich strukturgebende Funktion und die Vermittlung der mechanischen Stabilität von Biofilmen zugeschrieben (Flemming *et*

al., 2007). Ebenfalls wird für Proteine eine strukturelle Aufgabe vermutet. Die hauptsächliche Funktion von extrazellulären Proteinen wird aber in Enzymen gesehen, welche den Abbau von Makromolekülen zu niedermolekularen Substanzen katalysieren (Higgins & Novak, 1997; Hoffman & Decho, 1999).

Generell unterscheiden sich die Konzentrationen der einzelnen Komponenten je nach Habitat und hängen zum großen Teil von den verschiedenen Mikroorganismen, deren Stoffwechselleistungen, Medien und Umgebungsbedingungen ab (Branda *et* al., 2005; Sutherland, 2001; Flemming *et* al., 2007).

4.2 Populationsstruktur der Algen - assoziierten bakteriellen Gemeinschaft

Die Methoden zur Untersuchung der Zusammensetzung mikrobieller Lebensgemeinschaften haben sich in den letzten Jahrzehnten stetig weiterentwickelt. Neben den konventionellen, kultivierungsabhängigen Techniken haben sich besonders molekularbiologische Analysen etabliert. Die Polymerase Ketten Reaktion (PCR) von 16S rRNA Gensequenzen (Woese, 1987; DeLong, 1992), Klonierung und Sequenzierung (Woese, 1987; Amann *et* al., 1995), die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung Technik (FISH; Amann *et* al., 1995; Joux & Lebaron, 2000; Pernthaler *et* al., 2002; Crocetti *et* al., 2006), die Denaturierende Gradient Gel Elektrophorese (DGGE; Muyzer & Smalla, 1998; Muyzer, 1999; Sigler *et* al., 2004) sowie Metagenomanalysen werden heutzutage häufig angewendet, um die Struktur und Populationsdynamik von Mikroorganismen zu analysieren.

Für die phylogenetische Analyse der verschiedenen Biofilmentwicklungsphasen (T0-T5) wurden die 16S rRNA Gene unter anderem amplifiziert und kloniert. Insgesamt konnten 28 OTUs ermittelt werden. Die analysierten Biofilme aus den DGGE und RFLP Analysen zeigten zudem, dass die mikrobiellen Populationen zu den untersuchten Zeitpunkten relativ stabil waren. Die Ergebnisse zur Zusammensetzung und Struktur der bakteriellen Populationen konnten zudem durch die Metagenom-basierten Analysen bestätigen werden.

Die häufigsten bakteriellen Organismen waren Vertreter der Familien der Sphingomonadaceae, Caulobacteraceae, Rhizobiaceae (Alphaproteobacteria), (Gammaproteobacteria), Comamonadaceae (Betaproteobacteria), Xanthomonadaceae Sphingobacteriaceae und Flavobacteriaceae (Bacteroidetes).

Unter den Alphaproteobacteria kommen zahlreiche aquatisch lebende Arten vor. Die Zellen der Gattungen Caulobacter und einiger Arten von Brevundimonas besitzen Prostheka (Zellfortsätze), sogenannte Stiele, mit deren Hilfe sich die Bakterien an Pflanzenmaterial oder an andere Bakterien anheften können. Die Sphingomonadales wurden erst vor relativ kurzer Zeit beschrieben (Yabuuchi & Kosako, 2005). Vertreter dieser Ordnung sind in Böden und Gewässern weit verbreitet. Sie sind aerob und chemoorganotroph. Das namensgebende Merkmal sind die in der äußeren Membran der Zellen vorkommenden Sphingolipide. Viele Arten sind in der Lage toxische Verbindungen abzubauen (Macur *et* al., 2001). Die Produktion extrazellulärer Substanzen ist ebenfalls typisch für Vertreter dieser Bakteriengruppe (Lobas *et* al., 1994). Darüber hinaus stehen aber auch Mechanismen zur Diskussion welche auf eine antimikrobielle Aktivität gegen Pathogene schließen lassen oder auch Quorum sensing Signalmoleküle abbauen können (Mei *et* al., 2010).

Vertreter der Betaproteobacteria wurden bisher häufig in Süßwasserhabitaten nachgewiesen. Eine der auffälligen Eigenschaften der Burkholderiales ist es zum Beispiel viele verschiedene Zucker, Fettsäuren, Di- und Tricarbonsäuren, einwertige Alkohole, Glykole, Polyole, aromatische Verbindungen, Aminosäuren sowie Amine zu verwerten. In jüngster Vergangenheit konnte auch die Fähigkeit der Burkholderiales zum Abbau einer Vielzahl von aromatischen Schadstoffen analysiert werden (Perez-Pantoja *et* al., 2012).

Das Phylum Bacteroidetes setzt sich aus drei Klassen zusammen, den Bacteriodetes, den Flavobacteria und den Sphingobacteria. Es handelt sich um eine physiologisch sehr heterogene Gruppe, deren Vertreter in der Natur weit verbreitet sind. Man findet sie in Böden, Sedimenten und Gewässern sowie im Intestinaltrakt oder auf der Haut von Tieren. So konnte bereits für die Ordnung der Cythophagales Proteine identifiziert werden, die cellulolytische Aktivität zeigten (Xie *et* al., 2007). Ebenso zeigt auch die Ordnung der Flavobacteriales zahlreiche Möglichkeiten zur Nutzung von verschiedenen Polysacchariden unter Verwendung von Glycosidhydrolasen, Polysaccharid-Lyasen und Esterasen (McBride *et* al., 2009; Burke *et* al., 2011).

Beim Vergleich der oben aufgeführten Phyla hinsichtlich phänotypischer Eigenschaften fällt auf, dass sowohl das Phylum Bacteroidetes als auch viele der hier nachgewiesenen Proteobacteria Arten umfassen, die einen ungewöhnlichen Aufbau der Membranlipide zeigen. Sowohl die proteobakteriellen Sphingomonaden als auch die Sphingobakterien im Phylum Bacteroidetes besitzen Spingolipide anstelle der sonst für Gram-negative Bakterien üblichen Lipopolysaccharide in der äußeren Membran der Zellwand. Allerdings muss bei kultivierungsunabhängigen Populationsanalysen grundsätzlich bedacht werden, dass bestimmte Arten oder Bakteriengruppen methodenbedingt häufiger nachgewiesen werden, als andere. Einige Organismen besitzen mehrere Kopien des 16S rRNA Gens (Klappenbach *et* al., 2000). Auch die Konzentration der DNA einzelner Bakterienarten, der GC-Gehalt der Nukleotidsequenz oder die verwendeten Primer (Suzuki & Giovannoni, 1996; Klindworth *et* al., 2012) sowie die Erreichbarkeit der Zielsequenzen für die Primer, bedingt durch die Beschaffenheit der Zellhülle oder durch die Exopolymer-Matrix können Gründe für eine selektive Amplifikation sein.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte ein relativ breites Spektrum phylogenetisch sehr unterschiedlicher Bakterien nachgewiesen werden, darunter auch mutmaßliche Biofilmbildner. Betrachtet man die Populationsstruktur der einzelnen Proben der Reaktoren, so ist zu erkennen, dass die bakteriellen Zusammensetzungen weitgehend mit der zum Animpfen verwendeten Algen-Kulturen übereinstimmt. Das lässt darauf schließen, dass ein Großteil der in den Reaktoren nachgewiesenen Bakterien über das Inokulum in den Reaktor gelangt. Die beobachteten Pilze, Kieselalgen und Goldalgen sind höchstwahrscheinlich Verunreinigungen aus früherer Nutzung der PBRs. Darüber hinaus wurden die Umweltbedingungen durch die industrielle Steuerung von pH-Wert, Temperatur und Nährstoffkonzentration konstant gehalten, welches eine kontinuierliche Kultivierung des Algen-Bakterien-Konsortiums ermöglichte und vermutlich die geringen Verschiebungen der bakteriellen Zusammensetzung bedingte.

4.3 Kultivierung von Mikroorganismen aus dem PBR

Es wird angenommen, dass nur etwa 1% der Bakterien kultiviert werden können (Staley & Konopka, 1985; Amann *et* al., 1995; Hugenholtz *et* al., 1998). Es sind derzeit schätzungsweise 61 verschiedene bakterielle Phyla bekannt, von denen 31 keine kultivierbaren Vertreter beinhalten (Hugenholtz *et* al., 2009). Die Topologie der Archaea ist derzeit wenig erforscht. Die bisher kultivierten Spezies (54) repräsentieren allerdings nur einen Bruchteil der gesamten Vielfalt, der 49 archaeellen Linien (Auguet *et* al., 2009).

Trotz der Verfügbarkeit von unterschiedlichen molekularen Methoden zur Analyse von bakteriellen Gemeinschaften, sind kultivierungsabhängige Untersuchungen von besonderer Bedeutung. In dieser Arbeit konnten durch Plattierung der Algenkultur auf Festmedium (NB, R2A) nur zwei bakterielle Isolate kultiviert werden. Erst durch die Zugabe von Überstand und lebenden Zellen aus der Mikroalgenkultur konnte das Wachstum von sechs weiteren Bakterienarten stimuliert werden. Die durchgeführten Versuche legen nahe, dass nur ein Bruchteil der Mikroorganismen im PBR unter Laborbedingungen kultivierbar ist. Somit ist davon auszugehen, dass die Kultivierbarkeit der bakteriellen Populationen von der Synthese noch nicht identifizierter Verbindungen und/oder Wachstumsfaktoren der Mikroalgen oder anderen Bakterien abhängt.

Die Schwierigkeit der Kultivierung einzelner Mikroorganismen beruht auf verschiedenen Faktoren. Einzelne **Bakterien** haben unterschiedliche Wachstumsanforderungen, einschließlich des **Bedarfs** spezifischen Nährstoffen, pH-Bedingungen, von Inkubationstemperaturen oder Konzentrationen von Sauerstoff. Generell werden die Anforderungen für das Wachstum eines Bakteriums unter Laborbedingungen durch künstliche Stimuli simuliert. In Mischkulturen spielt auch die Konkurrenz um Nährstoffe, die Synthese von Bakteriozine oder antibakterielle Substanzen durch andere Bakterien innerhalb des Mediums eine entscheidende Rolle bei der Isolierung von Mikroorganismen (Tamaki et al., 2005). Besonders schwierig ist die Isolierung von Bakterien aus Biofilmen. Die verschiedenen Wechselwirkungen von unterschiedlichen Mikroorganismen in einem Biofilm ermöglichen es den Organismen als komplexe Einheit zu agieren (Stoodley et al., 2002). Viele Bakterien interagieren mit anderen Organismen und Mikroorganismen. Vor allem beim Abbau komplexer Substanzen für die Bereitstellung von Nährstoffen sind viele Bakterien auf die Abbauprodukte von anderen angewiesen (Mikx & Van der Hoeven, 1975; Belenguer et al., 2006). Ein weiteres wesentliches Merkmal ist die bakterielle Zell-Zell-Kommunikation (Miller & Bassler, 2001). Hierzu gehören Quorum-Sensing-Mechanismen, die an der Regulation der bakteriellen Gemeinschaft, Struktur und physiologischen Eigenschaften beteiligt sind (De Kievit et al., 2001; Konaklieva & Plotkin, 2006). Botenstoffe, welche nur innerhalb des natürlichen Lebensraum vorhanden sind, sind vermutlich wesentlich für das bakterielle Wachstum (Nichols et al., 2008). In Ermangelung dieser nützlichen Interaktionen können einige Bakterien in Monokulturen nicht wachsen. Diese metabolischen Interaktionen zwischen verschiedenen Spezies erschweren die Kultivierung und Isolierung von einzelnen Bakterien in Reinkultur (Barcina et al., 1990; Colwell, 2000; Nichols et al., 2008).

4.4 Metabolisches Potenzial der bakteriellen Population

Um Stoffwechselprozesse und Interaktionen von mikrobiellen Populationen zu verstehen, müssen die einzelnen Komponenten des Konsortiums und die damit verbundenen Funktionen identifiziert werden. Traditionell werden mikrobielle Funktionen und wechselseitige Beziehungen durch Beobachtung des mikrobiellen Wachstums und den physiologischen Eigenschaften von einzelnen Mikroorganismen analysiert. Dieser Ansatz unterschätzt mit unter die funktionellen Kapazitäten von Mikroorganismen, da die komplexen biotischen und abiotischen Umweltfaktoren unter Laborbedingungen nicht genau reproduziert werden können. Ein effektiver Weg, um die potentiellen funktionellen Möglichkeiten von Mikroorganismen eines Habitats zu verstehen, ist die Identifizierung von Gensequenzen. Metagenomanalysen bieten Möglichkeiten für die Entschlüsselung von Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Mikroorganismen und ihrer Umwelt, ihrer primär genutzten Energiequellen, den dominanten Biosynthesewegen und deren ökologischen Funktionen (Riesenfeld et al., 2004; Tringe et al., 2005; Simon et al., 2009). Die hohe Datenmenge, welche durch "Next Generation Sequencing" - Technologien generiert werden kann, ermöglicht eine schnelle Identifizierung von Kernprozessen mikrobieller Populationen (Edwards et al., 2006). Im Rahmen dieser Analysen muss allerdings berücksichtigt werden, dass wahrscheinlich eine kleine, aber signifikante Anzahl von ORFs und Genen durch überlappende Sequenzhomologien und/oder Leserahmenverschiebungen nicht richtig zugeordnet werden können. Das metabolische Potenzial der Mikroorganismen im untersuchten PBR wurde hauptsächlich durch den Vergleich der Datensätze für zelluläre Prozesse (KEGG) und funktionale Kategorien (COG) bestimmt.

Die mikrobielle Lebensweise untersuchten Biofilm in dem hier setzt sich höchstwahrscheinlich aus aeroben sowie mikroaeroben Wachstum zusammen. Insgesamt konnten 1.844 Cytochrom-kodierende Gene ermittelt werden, welche auf unterschiedliche und verzweigte Elektronentransportketten der Bakterien hinweisen. Verzweigte Elektronentransportketten sind eine Anpassung an unterschiedliche Sauerstoffkonzentrationen und in einer Vielzahl von Bakteriengenomen beobachtet worden (Anraku, 1988). Darüber hinaus konnten alle Gene, welche für die Nitratatmung notwendig sind, identifiziert werden. Hierdurch kann eine breite Palette von Stoffwechselwegen unter verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen genutzt werden (Stewart & Franklin, 2008; Williamson et al., 2012).

Die Metagenomsequenzen lassen generell vermuten, dass die Bakterien innerhalb des Photobioreaktors hauptsächlich eine heterotrophe Lebensweise bevorzugen, indem sie die von den Algen zur Verfügung gestellten Kohlenstoff- und Energiequellen verstoffwechseln. Die Klassifizierung der Gensequenzen zu KEGG Kategorien zeigte, dass 16,6% der Gene in den Aminosäurestoffwechsel involviert waren. Weiterhin konnten verschiedene Gene identifiziert werden, welche für den Abbau von Polysacchariden, Proteinen und Cellulose (16,1%), sowie zum Abbau von xenobiotischen und aromatischen Verbindungen (4,2%) notwendig sind. Die ermittelten Sequenzübereinstimmungen zum Lipidmetabolismus (4,8%) sind möglicherweise für die Oxidation / Reduktion der von den Algen gebildeten Lipide von Bedeutung.

Darüber hinaus sind einige der Mikroorganismen auch in der Lage durch Nutzung des Calvin-Benson-Bassham Zyklus autotroph zu wachsen. Weiterhin konnten Carboxydotrophe Bakterien identifiziert werden. Sie bilden eine kleine, aber vielfältige Gruppe von aeroben Bakterien, welche vor allem zu den Proteobacteria und Firmicutes gerechnet werden. Sie nutzen CO als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle (Meyer *et* al., 1990; King, 2003). Die Homologien zu den Kohlenmonoxid-Dehydrogenasen (CoxL / CutL, CoxM / CutM, CoxS / CutS und CoxG - Untereinheiten) sind wahrscheinlich eine Folge der Einleitung von Rauchgas aus dem Blockheizkraftwerk in die PBRs (Hindersin *et* al., 2013).

4.5 Biosynthese von B-Vitaminen

Bereits 1937 beschrieben die Studien von Lwoff und Dusi, dass einige Mitglieder der Chlorophyta und Cryptophyta Thiamin als Wachstumsfaktor benötigen (Croft *et* al., 2006). In den folgenden Jahren beschrieben viele Studien Algenarten, die auf verschiedene Kombinationen von drei B-Vitamine angewiesen sind: Vitamin B12 (Cobalamin), Vitamin B1 (Thiamin) und Vitamin B7 (Biotin) (Provasoli & Carlucci, 1974). Die bisher verfügbaren Daten zeigten eine weite Verbreitung von Vitamin-Auxotrophie unter verschiedenen Algenarten. In den Untersuchungen von Croft *et*. al (2006) waren mehr als die Hälfte der analysierten Algenarten auxotroph gegenüber Cobalamin, während 22% Thiamin und ein geringer Anteil (5%) Biotin für ihr Wachstum benötigten.

Biotin ist ein Cofaktor für viele essentielle Carboxylasen, einschließlich Acetyl-Coenzym A (CoA)-Carboxylasen, welche in die Fettsäuresynthese involviert sind (Streit & Entcheva, 2003). Das Molekül besteht aus einem Imidazolring, welcher mit einem schwefelhaltigen Tetrahydrothiophenring mit einer Fettsäure-Seitenkette kondensiert ist. Wie Biotin, spielt auch Thiamin eine entscheidende Rolle im Kohlenstoffmetabolismus. Die aktive Form des Vitamins ist Thiaminpyrophosphat (TPP). Dieser Cofaktor ist assoziiert mit einer Reihe von Enzymen, die in den primären Kohlenhydrat- und Aminosäure-Stoffwechsel involviert sind, einschließlich Pyruvatdehydrogenasen, Transketolasen, α -Ketosäuredecarboxylasen und α -Ketosäureoxidasen (Schowen, 1998). Cobalamin besteht aus einem Kobalt enthaltenden Tetrapyrrol. Es wirkt als Cofaktor für verschiedene Enzyme, die Umlagerungs- und

Da Biotin, Thiamin und Cobalamin für viele unterschiedliche Algenarten essentiell sind, müssen diese Vitamine im jeweiligen Habitat vorhanden sein und es müssen Mechanismen für ihre Aufnahme in die Algenzellen existieren. Diese drei Vitamine sind wasserlöslich, was darauf hindeutet, dass sie ins Medium abgegeben und verwertet werden können. In wässrigen Systemen liegt die Konzentration von Vitamin B12 zwischen 0 und 3 ng/l (Carlucci, 1970; Keshtacher-Liebso *et* al., 1995; Croft *et* al., 2006). Mehrere Studien haben allerdings gezeigt, dass verschiedene Vitamin-B12-abhängigen Algen für ihr Wachstum mindestens eine Konzentration von 10 ng/l Cobalamin benötigen (Provasoli & Carlucci, 1974). Der Gehalt an Thiamin variiert in natürlichen Umgebungen zwischen 8 und 15 ng/l. Darüber hinaus konnte an verschiedenen Punkten des Pazifischen Ozeans eine Biotinkonzentration zwischen 1 und 4 ng/l gemessen werden (Carlucci, 1970).

In dieser Arbeit konnten Werte für die inaktive Form von Cobalamin mit 0,09 und 0,16 ng/ml ermittelt werden. Die Daten zur aktiven Form des Cobalamins lagen zwischen 0,05 und 0,27 ng/ml. Der Biotingehalt des in dieser Arbeit verwendeten Testreaktors lag zwischen 7,38 und 15,40 ng/ml. Das hier untersuchte Metagenom des Algen-Bakterien-Konsortiums belegte zudem, dass alle erforderlichen Schritte zur Synthese von Cobalamin, Biotin und Thiamin in mehreren Kopien vorlagen. Cobalamin wird ausschließlich von Bakterien und Archaea synthetisiert, welches unter aeroben und anaeroben Bedingungen gebildet werden kann (Warren *et* al., 2002). Darüber hinaus sind Prokaryoten in der Lage Biotin und Thiamin zu synthetisieren (Begley *et* al., 1999; Streit & Entcheva, 2003).

Wenige Studien weisen drauf hin, dass viele Algen in der Gegenwart von Bakterien eine höhere Produktivität besitzen (Fogg, 1965; Droop, 2007; Tang *et* al., 2010). Der Mangel an B-Vitaminen in einem Habitat in Kombination mit der Tatsache, dass die Mehrzahl der Algen diese Vitamine benötigen, deutet darauf hin, dass eine symbiotische Interaktion zwischen Bakterien und Algen die Norm ist.

4.6 Metabolisches Potenzial zur Biofilmbildung

Die Merkmale zur mikrobiellen Biofilmbildung erstrecken sich über die Anheftung von Bakterien auf Oberflächen, die Mikrokoloniebildung und die Reifung der Biofilmstruktur (Stoodley *et* al., 2002; Klausen *et* al., 2006; Monds & O'Toole, 2009).
Innerhalb des PBR Metagenoms konnte eine Vielzahl von Genen identifiziert werden, die wesentlich für die Bildung von Biofilmen verantwortlich sind, einschließlich Signalmoleküle wie Quorum Sensing (QS) Autoinducer und 3,5 zyklische-di-GMP. Letzterer ist ein wichtiger sekundärer Botenstoff, welcher bei planktonischen Zellen die Umgestaltung zur sessilen Form bewirkt (Cotter & Stibitz, 2007; Ueda *et* al., 2009; Newell *et* al., 2011). In diesem Rahmen konnten 429 GGDEF- und 250 EAL Domain Proteine zugeordnet werden, welche maßgeblich an der Genregulation und -expression von Adhäsin und weiteren Biofilm EPS Komponenten beteiligt sind (Gjermansen *et* al., 2006).

Als Quorum sensing bezeichnet man eine Dichte-abhängige Form der bakteriellen Zell-Zell-Kommunikation. Moleküle namens Autoinducer werden hierbei synthetisiert und freigesetzt und können spezifische Prozesse auf intra- und interspezies Ebene beeinflussen. Bei Erreichen einer Grenzkonzentration löst die Autoinduktion die Induktion oder Repression von Genen aus, die zur Biofilm Reifung benötigt werden. Darüber hinaus kommt es zu einem funktionell koordinierten Verhalten einer Bakterienpopulation einschließlich der Expression von Virulenzfaktoren. N-Acyl-L-Homoserinlactone (AHLs, AI-1) sind die wichtigsten Signalmoleküle in diesem Zelldichte-abhängigen System der Genregulation und werden in vielen Gram-negativen Bakterien in der Regel durch LuxI-ähnliche Proteine synthetisiert (Galloway *et* al., 2011; LaSarre & Federle, 2013). Interessanterweise konnten nur wenige Gene ermittelt werden, die in Zusammenhang mit der Synthese von AI-1 Molekülen stehen. Dieser Befund legt die Hypothese nahe, dass innerhalb dieser ökologischen Nische Autoinducer nur eine untergeordnete Rolle bei der Bildung von Biofilmen spielen.

Es konnten jedoch 397 Gene identifiziert werden, welche für T4 Pili kodieren. Diese Zellfortsätze sind für die Beweglichkeit von Zellen verantwortlich sowie an deren Befestigung an Oberflächen beteiligt. Darüber hinaus vermitteln sie Wechselwirkungen zwischen Zellen unterschiedlicher Arten (Mattick, 2002; Craig *et al.*, 2004; Christie *et al.*, 2005; Dulla *et al.*, 2012). Mehr als 40 Gene sind bereits bekannt, die am Aufbau von T4 Pili beteiligt sind. Einige zeigen Sequenzhomologien mit Komponenten aus dem Typ-2-Sekretionssystem (T2SS) (Christie *et al.*, 2005). Es ist weiterhin bemerkenswert, dass T4 Pili an der Aufnahme von DNA und dem Aufbau von Pseudopili beteiligt sind (Dubnau, 1999; Entcheva *et al.*, 2001; Takeno *et al.*, 2012). Diese natürliche Kompetenz ermöglicht nicht nur die Erkennung von DNA und deren Aufnahme in die Zelle sondern auch die Integration durch Rekombination in das Genom. Die Bindung der exogenen DNA wird im Allgemeinen durch die comEA loci ermöglicht (Chen & Dubnau, 2004). In dem hier analysierten PBR-Metagenom konnten 11 Sequenzen als comEA-Homologe identifiziert werden. In Bezug auf

den Austausch von DNA durch Konjugation wurden 233 Gene ermittelt, welche für Typ 4-Konjugation-Pili kodieren. Die Aufnahme von DNA über natürliche Kompetenz ist ein weiterer Mechanismus, um auf ungünstige Umweltbedingungen zu reagieren, da die damit verbundene mögliche Synthese neuer Genprodukte zur Nischenadaption führen kann.

4.7 Strategien zur Inhibierung von mikrobiellen Biofilmen

Strategien zur Minimierung bzw. Inhibierung von Biofilmen sehen in erster Linie die Störung der primären Adhäsion der Bakterien auf Oberflächen, die Verringerung der bakteriellen Reproduktion, die Einschränkung der interzellulären Kommunikation sowie die Zerstörung der extrazellulären Matrix vor (Stewart, 2003).

Chemische Modifikationen sind die wichtigste Strategie zur Biofilmverhinderung auf Medizinprodukten. Antibiotika, Biozide und Ionen-Beschichtungen (z. B. Silber) werden häufig als Methoden zur Biofilminhibierung verwendet. Typischerweise sind diese nur für eine kurze Zeit wirksam. Nach dem Auslaugen des antimikrobiellen Mittels wird die Wirksamkeit der Beschichtung verringert (Dror et al., 2009; Vasilev et al., 2009). Um die unerwünschten Wirkungen der Auslaugung zu vermeiden, können antimikrobielle Wirkstoffe auf Oberflächen mit langen, flexiblen Polymerketten immobilisiert werden. Diese Ketten sind an der Oberfläche verschiedener industrieller Vorrichtungen durch kovalente Bindungen verankert. Eine in vitro Studie zeigte, dass, wenn N-Alkylpyridinium-Bromid (ein antimikrobielles Mittel) an ein Poly(4-vinyl-N-Hexylpyridin) befestigt war, eine Inhibierung von S. epidermidis, E. coli, und P. aeruginosa bis zu 99% beobachtet wurde (Jansen & Kohnen, 1995). Die Dispersionskräfte zwischen den Polymerketten und den Zellen der Mikroorganismen verhindern dabei, dass Bakterien an Oberflächen binden. Auch wird die Fähigkeit von Bakterien an einer Oberfläche zu haften, teilweise durch die Enthalpie der Adhäsion von Oberflächen bestimmt. So bedingt die Oberflächenrauheit eine entsprechende Haftung von verschiedenen Bakterien. Produkte oder industrielle Anlagen, welche bakterielle Habitate darstellen, sollten daher glatte Oberflächen besitzen, um eine mögliche Biofilmbildung zu minimieren (Meiron & Saguy, 2007). Ebenfalls hat sich eine Änderung der Oberflächenladung von Polymeren als ein wirksames Mittel zur Biofilm-Prävention etabliert. Basierend auf den Prinzipien der Elektrostatik stoßen geladenen Teilchen anderen Teilchen gleicher Ladung ab (Hazan et al., 2006).

Neben technischen Modifikationen kann auch die enzymatische Spaltung der EPS Komponenten eine Inhibierung der bakteriellen Anlagerung an Oberflächen bewirken. Der Abbau der Biofilmmatrix erfolgt in erster Linie durch Hydrolasen (Lipasen, Proteasen oder Aminidasen) und Lyasen (Zhang & Bishop, 2003; Dobretsov & Qian, 2004; Laue *et* al., 2006; Ude *et* al., 2006). Diese Enzyme katalysieren hierbei den Abbau komplexer Verbindungen in ihre Spaltprodukte.

Ein anderer Aspekt ist die Unterdrückung der Zell-Zell-Kommunikation oder die Wirkung von sekundären Botenstoffen und Proteinen (Czajkowski & Jafra, 2009; Bijtenhoorn *et* al., 2011; Mei *et* al., 2010). Viele bakterielle Genome haben mehrere Gene, die c-di-GMP Phosphodiesterase-Aktivität haben könnten, welche auf zellulärer Ebene die Konzentration von c-di-GMP reduziert (Galperin *et* al., 2001; Simm *et* al., 2004; Tischler & Camilli, 2004). Dieser Zusammenhang bewirkt eine negative Regulation der Biofilmbildung und ist an der Dispersion von bakteriellen Gemeinschaften aus Biofilmen beteiligt (Bobrov *et* al., 2005; Karatan & Watnick, 2009). Die Inaktivierung von AHL Signalmolekülen wird hauptsächlich durch Hydrolasen (N-Acyl-Homoserin Laktonasen und N-Acyl-Homoserin-Lacton Acylasen) katalysiert. Die Mehrheit der bisher identifizierten Enzyme sind Lactonasen (EC 3.1.1 -.). Die Wirkungsweise beruht hierbei auf der Hydrolyse des Lactonringes der AHL-Moleküle (Czajkowski & Jafra, 2009; Mei *et* al., 2010). Darüber hinaus konnten Acylasen (EG 3.5.1 -.) in einer Vielzahl von Bakterien identifiziert werden. Aminoacylasen spalten den Lacton-Ring von Fettsäuren und beeinflussen somit Autoinducer I-Moleküle (Uroz *et* al., 2005, 2007; Lin *et* al., 2003).

Die in dieser Arbeit untersuchten Fosmidklone mit potentiell biofilminhibierender Wirkung zeigten Sequenzhomologien zu EPS-modifizierenden Enzymen und toxischen Genprodukten. Weiterhin sind Genprodukte denkbar, welche die Zell-Zell-Kommunikation beeinflussen. Der Zusatz von biofilminhibierenden Substanzen ist allerdings nur eine Option, um mikrobielle Aggregate innerhalb der Photobioreaktoren zu inhibieren. Auch Veränderungen der Kultivierungsparameter (Zelldichte, pH-Wert, Temperatur) können Möglichkeiten zur Minimierung der Biofilmbildung sein. Allerdings zeigten die vorherigen Ergebnisse zur Ökologie der Mikroalgenkultur deutlich, dass die Mikroalgen auf die synthetisierten Stoffwechselprodukte der bakteriellen Populationen angewiesen sind. Demzufolge ist es notwendig Inhibitoren zu ermitteln, welche die Biofilmbildung reduzieren, aber keinen Einfluss auf das Wachstum der mikrobiellen Gemeinschaft haben.

4.8 Schlussfolgerungen und Perspektiven

Metagenomanalysen gaben in den vergangenen Jahren Einblicke in die Ökologie verschiedener Habitate. Hierdurch konnte die biologische Vielfalt und die möglichen biochemischen Funktionen bakterieller Populationen näher analysiert werden. Einige dieser Studien sind in den Referenzen (Schmeisser *et al.*, 2003; Tringe *et al.*, 2005; Gomez-Alvarez *et al.*, 2012; Jones *et al.*, 2012) aufgeführt. In diesen Studien wird allerdings auch deutlich, dass viele verschiedene biotische und abiotische Faktoren jede dieser Populationen prägen und jedes Habitat sich deutlich in Struktur, phylogenetischer Zusammensetzung und genetischem Potential unterscheidet. Überraschenderweise wurden bisher nur wenige Biofilme über "Next Generation Sequencing" - Technologien analysiert, welche mehrere Organismen aus unterschiedlichen Phyla beinhalteten.

Zusammenfassend ergaben die hier generierten Daten einen detaillierten Einblick in die mikrobielle Gemeinschaft und den putativen bakteriellen Stoffwechselleistungen eines PBR-Biofilms. Insgesamt konnten 28 OTUs innerhalb der Biofilmpopulation ermittelt werden. Darüber hinaus zeigten zusätzliche Analysen mittels DGGE und RFLP, dass die Zusammensetzung der bakteriellen Populationen über die Zeit relativ stabil waren. Die Sequenz-basierten Daten und die funktionellen Analysen unterstützten eindeutig frühere Erkenntnisse in Bezug auf die bakterielle Produktion von B-Vitaminen. Weiterhin legen die Ergebnisse nahe, dass das Wachstum der Mikroalgen-Bakterien-Populationen zum Teil von Verbindungen abhängt, die durch die Mikroalgen und/oder Bakterien innerhalb der Gemeinschaft synthetisiert werden. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass viele Sequenzabschnitte der bakteriellen Populationen für esterolytische und lipolytische Enzyme kodierten. Dieser Befund wurde durch Ermittlung aktiver lipolytischer Klone und durch die Messung von hydrolytischer Aktivität in den Kulturüberständen unterstützt.

Die bisher ermittelten Daten könnten zur Optimierung von Kultivierungsbedingungen genutzt werden, um die Produktivität von Photobioreaktoren und Mikroalgenkulturen in Bezug auf die CO₂-Fixierung, der Produktion von Biokraftstoffen und/oder anderen wertvollen Verbindungen des Mikroalgen-Bakterien-Konsortiums zu verbessern.

5 Literaturverzeichnis

Abomohra A.F., Wagner M., El-Sheekh M., Hanelt D. (2012). "Lipid and total fatty acid productivity in photoautotrophic fresh water microalgae: screening studies towards biodiesel production." J. Appl. Phycol. 2012:1-6.

Allsopp D. (2004). "Introduction to biodeterioration", Cambridge University Press.

Amann R.I., Binder B.J., Olson R.J., Chisholm S.W., Devereux R., Stahl D.A. (1990). "Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations." Appl. Environ. Microbiol. 56(6):1919-25.

Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. (1995). "Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation." Microbiol. Rev. 59(1):143-69.

An D., Danhorn T., Fuqua C., Parsek M.R. (2006). "Quorum sensing and motility mediate interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens* in biofilm cocultures." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 103(10), 3828-3833.

Andersen R.A. (2004). "Biology and systematics of heterokont and haptophyte algae." Am. J. Bot. 91(10):1508-1522.

Anraku Y. (1988). "Bacterial Electron Transport Chains." Annu. Rev. Biochem. 57(1):101-132.

Auguet J.C., Barberan A., Casamayor E.O. (2009). "Global ecological patterns in uncultured Archaea." ISME J. 4(2):182-190.

Azam F., Long R.A. (2001). "Sea snow microcosms." Nature. 414(6863):495, 497-8.

Azam F., Malfatti F. (2007). "Microbial structuring of marine ecosystems." Nat. Rev. Microbiol. 5(10):782-791.

Bairoch A. (2000). "The ENZYME database in 2000." Nucleic Acids Res. 28(1):304-5.

Banin E., Vasil M.L., Greenberg E.P. (2005). "Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 102(31):11076-81.

Barcina I., González J.M., Iriberri J., Egea, L. (1990). "Survival strategy of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* in illuminated fresh and marine systems." J. Appl. Micobiol. 68(2):189-198.

Battersby A.R., Bushell M.J., Jones C., Lewis N.G., Pfenninger A. (1981). "Biosynthesis of vitamin B12: identity of fragment extruded during ring contraction to the corrin macrocycle." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 78(1):13-5.

Begley M., Gahan C.G., Hill C. (2005). "The interaction between bacteria and bile." FEMS Microbiol. Rev. 29(4):625-651.

Begley T.P., Downs D.M., Ealick S.E., McLafferty F.W., Van Loon A.P.G.M., Taylor S., Campobasso N., Chiu H.-J., Kinsland C., Reddick J.-J. (1999). "Thiamin biosynthesis in prokaryotes." Arch. Microbiol. 171(5):293-300.

Begley T.P., Ealick S.E., McLafferty F.W. (2012). "Thiamin biosynthesis: still yielding fascinating biological chemistry." Biochem. Soc. Trans. 40(3):555-60.

Belenguer A., Duncan S.H., Calder A.G., Holtrop G., Louis P., Lobley G.E., Flint H.J. (2006). "Two routes of metabolic cross-feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and butyrate-producing anaerobes from the human gut." Appl. Environ. Microbiol. 72(5):3593-9.

Berger P.S., Rho J., Gunner H. (1979). "Bacterial suppression of *Chlorella* by hydroxylamine production." Water Res. 13(3):267-273.

Beyhan S., Bilecen K., Salama S.R., Casper-Lindley C., Yildiz F.H. (2007). "Regulation of rugosity and biofilm formation in *Vibrio cholerae*: comparison of VpsT and VpsR regulons and epistasis analysis of vpsT, vpsR, and hapR." J. Bacteriol. 189(2):388-402.

Bidle K.D., Azam F. (1999). "Accelerated dissolution of diatom silica by marine bacterial assemblages." Nature. 397(6719):508-512.

Bidle K.D., Azam F. (2001). "Bacterial control of silicon regeneration from diatom detritus: significance of bacterial ectohydrolases and species identity." Limnol. Oceanogr. 46:1606-1623.

Bijtenhoorn P., Mayerhofer H., Müller-Dieckmann J., Utpatel C., Schipper C., Hornung C., Szesny M., Grond S., Thürmer A., Streit W.R. (2011). "A novel metagenomic short-chain dehydrogenase/reductase attenuates *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence on *Caenorhabditis elegans*." PloS One. 6(10):e26278.

Bobrov A.G., Kirillina O., Perry R.D. (2005). "The phosphodiesterase activity of the HmsP EAL domain is required for negative regulation of biofilm formation in *Yersinia pestis*." FEMS Microbiol. Lett. 247:123-130

Bodelier P.L. (2011). "Toward understanding, managing, and protecting microbial ecosystems." Front. Microbiol. 2:80.

Bodenmiller D., Toh E., Brun Y.V. (2004). "Development of surface adhesion in Caulobacter crescentus." J. Bacteriol. 186(5):1438-47.

Borowitzka L.J. (1992). "beta-Carotene production using algal biotechnology." J. Nutr. Sci. Vitaminol. Spec No:248-50.

Borowitzka M.A., Moheimani N.R., Borowitzka M. (2013). "Species and Strain Selection. Algae for Biofuels and Energy." Springer Netherlands. 5:77-89.

Boyd D.R., Sharma N.D., Allen C.C.R. (2001). "Aromatic dioxygenases: molecular biocatalysis and applications." Curr. Opin. Biotechnol. 12(6):564-573.

Bradford M.M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal. Biochem. 72:248-54.

Branda S.S., Vik S., Friedman L., Kolter R. (2005). "Biofilms: the matrix revisited." Trends Microbiol. 13(1):20-6.

Brehm U., Krumbein W.E., Palinska K.A. (2003). "Microbial spheres: a novel cyanobacterialdiatom symbiosis." Naturwissenschaften. 90(3):136-40. **Brenner S., Horne R.W.** (1959). "A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses." Biochim. Biophys. Acta. 34:103-10.

Brosius J., Dull T.J., Sleeter D.D., Noller H.F. (1981). "Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*." J. Mol. Biol. 148(2):107-27.

Burke C., Steinberg P., Rusch D., Kjelleberg S., Thomas T. (2011). "Bacterial community assembly based on functional genes rather than species." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 108(34):14288-14293.

Carlucci A.F. (1970). "The ecology of the plankton off La Jolla, California in the period April through September, 1967. II. Vitamin B12, thiamine and biotin." Bull. Scripps. Inst. Oceanogr. 17:23-30.

Carvalho A., Meireles L.A., Malcata F.X. (2006). "Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances." Biotechnol. Prog. 22(6):1490-1506.

Caspi R., Altman T., Dreher K., Fulcher C.A., Subhraveti P., Keseler I.M., Kothari A., Krummenacker M., Latendresse M., Mueller L.A., Ong Q., Paley S., Pujar A., Shearer A.G., Travers M., Weerasinghe D., Zhang P., Karp P.D. (2008). "The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases." Nucleic Acids Res. 40(Database issue):D742-53.

Chen I., Dubnau D. (2004). "DNA uptake during bacterial transformation." Nat. Rev. Micro. 2(3):241-249.

Chester N., Marshak D.R. (1993). "Dimethyl sulfoxide-mediated primer Tm reduction: a method for analyzing the role of renaturation temperature in the polymerase chain reaction." Anal. Biochem. 209(2):284-90.

Chinnasamy S., Ramakrishnan B., Bhatnagar A., Das K.C. (2009). "Biomass production potential of a wastewater alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under elevated levels of CO(2) and temperature." Int. J. Mol. Sci. 10(2):518-32.

Chisti Y. (2007). "Biodiesel from microalgae." Biotechnol. Adv. 25(3):294-306.

Christen M., Christen B., Folcher M., Schauerte A., Jenal U. (2005). "Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP." J. Biol. Chem. 280(35):30829-37.

Christensen B.E. (1999). "Physical and chemical properties of extracellular polysaccharides associated with biofilms and related systems." In Microbial Extracellular Polymeric Substances (pp. 143-154). Springer Berlin Heidelberg.

Christie P.J., Atmakuri K., Krishnamoorthy V., Jakubowski S., Cascales E. (2005). "Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems." Annu. Rev. Microbiol. 59:451-85.

Cohen Z. (1986). "Products from microalgae." In CRC Handbook of Microalgae Mass Culture (Richmond, A.; ed.) (pp. 421-454) Florida, CRC Press Boca Raton

Cole J.J. (1982). "Interactions Between Bacteria and Algae in Aquatic Ecosystems." Annu. Rev. Ecolsyst. 13(1):291-314.

Conrad A., Kontro M., Keinänen M.M., Cadoret A., Faure P., Mansuy-Huault L., Block J.C. (2003). "Fatty acids of lipid fractions in extracellular polymeric substances of activated sludge flocs." Lipids. 38(10):1093-1105.

Coolen M.J.L., Muyzer G., Rijpstra W.I.C., Schouten S., Volkman J.K., Sinninghe Damsté J.S. (2004). "Combined DNA and lipid analyses of sediments reveal changes in Holocene haptophyte and diatom populations in an Antarctic lake." Earth Planet. Sc. Lett. 223:225-239

Costerton J.W., Cheng K.J., Geesey G.G., Ladd T.I., Nickel J.C., Dasgupta M., Marrie T.J. (1987). "Bacterial biofilms in nature and disease." Annu. Rev. Microbiol. 41:435-64.

Cotter P.A., Stibitz S. (2007). "c-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation." Curr. Opin. Microbiol. 10(1):17-23.

Cottrell M.T., Kirchman D.L. (2000). "Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization." Appl. Environ. Microbiol. 66(12):5116-22.

Coveney M.F. (1982). "Bacterial uptake of photosynthetic carbon from freshwater phytoplankton." Oikos. 8-20.

Craig L., Pique M.E., Tainer J.A. (2004). "Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity." Nat. Rev. Microbiol. 2(5):363-78.

Crocetti G., Murto M, Björnsson L. (2006). "An update and optimisation of oligonucleotide probes targeting methanogenic Archaea for use in fluorescence in situ hybridisation (FISH)." J. Microbiol. Meth. 65(1):194-201.

Croft M.T., Lawrence A.D., Raux-Deery E., Warren M.J., Smith A.G. (2005). "Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria." Nature. 438(7064): 90-93.

Croft M.T., Warren M.J., Smith A.G. (2006). "Algae Need Their Vitamins." Eukaryotic Cell. 5(8):1175-1183.

Cryer D., Eccleshall R., Marmur J. (1975). "Isolation of yeast DNA." Prescott DM (ed.), Method Cell. Biol. 12:39-44

Czajkowski R., Jafra S. (2009). "Quenching of acyl-homoserine lactone-dependent quorum sensing by enzymatic disruption of signal molecules." Acta. Biochim. Pol. 56(1):1-16.

De Kievit T.R., Gillis R., Marx S., Brown C., Iglewski B.H. (2001). "Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns." Appl. Environ. Microbiol. 67(4):1865-73.

De Man J., Rogosa M., Sharpe M.E. (1960). "A medium for the cultivation of *lactobacilli*." J. Appl. Bacteriol. 23:130-135.

Deighton M., Borland R. (1993). "Regulation of slime production in *Staphylococcus epidermidis* by iron limitation." Infect. Immun. 61(10):4473-9.

DeLong E.F. (1992). "Archaea in coastal marine environments." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 89(12):5685-9.

Denter J., Bisping B. (1994). "Formation of B-vitamins by bacteria during the soaking process of soybeans for tempe fermentation." Int. J. Food Microbiol. 22(1):23-31.

Dewulf J., Van Langenhove H. (Eds.) (2006). "Renewables-based technology: sustainability assessment." Wiley. com.

Di Martino P., Fursy R., Bret L., Sundararaju B., Phillips R.S. (2003). "Indole can act as an extracellular signal to regulate biofilm formation of *Escherichia coli* and other indole-producing bacteria." Can. J. Microbiol. 49:443-449.

Dillon J. C., Phan P.A. (1993). "*Spirulina* as a source of proteins in human nutrition." Bulletin de l'Institut Oceanographique (Monaco) 0 (12):103-107.

Dobinsky S., Kiel K., Rohde H., Bartscht K., Knobloch J.K., Horstkotte M.A., Mack D. (2003). "Glucose-related dissociation between icaADBC transcription and biofilm expression by *Staphylococcus epidermidis*: evidence for an additional factor required for polysaccharide intercellular adhesin synthesis." J. Bacteriol. 185(9):2879-86.

Dobretsov S., Qian P.-Y. (2004). "The role of epibotic bacteria from the surface of the soft coral *Dendronephthya* sp. in the inhibition of larval settlement." J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 299:35-50.

Donlan R.M. (2002). "Biofilms: microbial life on surfaces." Emerg. Infect. Dis. 8(9), 881-90.

Donlan R.M., Costerton J.W. (2002). "Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms." Clin. Microbiol. Rev. 15(2):167-93.

Doucha J., Straka F., Lívanský K. (2005). "Utilization of flue gas for cultivation of microalgae *Chlorella* sp. in an outdoor open thin-layer photobioreactor." J. Appl. Phycol. 17(5):403-412.

Droop M.R. (2007 "Vitamins, phytoplankton and bacteria: symbiosis or scavenging?." J. Plankton Res. 29(2):107-113.

Dror N., Mandel M., Hazan Z., Lavie G. (2009). "Advances in Microbial Biofilm Prevention on Indwelling Medical Devices with Emphasis on Usage of Acoustic Energy." Sensors. 9(4):2538-2554.

Dubnau D. (1999). "DNA uptake in bacteria." Annu. Rev. Microbiol. 53:217-44.

Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. (1956). "Colorimetric method for determination of sugars and related substances." Anal. Chem. 28(3):350-356.

Duda J., Pedziwilk Z., Zodrow K. (1967). "Studies on the vitamin B12 content of the leguminous plants." Acta. Microbiol. Pol. (6):233-238.

Dulla G.F., Go R.A., Stahl D.A., Davidson S.K. (2012). "*Verminephrobacter eiseniae* type IV pili and flagella are required to colonize earthworm nephridia." ISME J. 6(6):1166-75.

Dworkin M., Falkow S. (2006). "Microbial Biofilms." In the Prokaryotes, Springer New York: (pp: 904-937).

Edwards R.A., Rodriguez-Brito B., Wegley L., Haynes M., Breitbart M., Peterson D.M., Saar M.O., Alexander S., Alexander E.C. Jr., Rohwer F. (2006). "Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology." BMC Genomics. 20(7):57.

Elend C., Schmeisser C., Leggewie C., Babiak P., Carballeira J.D., Steele H.L., Reymond J.L., Jaeger K.E., Streit W.R. (2006). "Isolation and biochemical characterization of two novel metagenome-derived esterases." Appl. Environ. Microbiol. 72(5):3637-3645.

Entcheva-Dimitrov P., Spormann A.M. (2004). "Dynamics and control of biofilms of the oligotrophic bacterium *Caulobacter crescentus*." J. Bacteriol. 186(24):8254-66.

Entcheva P., Liebl W., Johann A., Hartsch T., Streit W.R. (2001). "Direct Cloning from Enrichment Cultures, a Reliable Strategy for Isolation of Complete Operons and Genes from Microbial Consortia." Appl. Environ. Microbiol. 67(1):89-99.

Evans L.V. (Ed.). (2004). "Biofilms: recent advances in their study and control." CRC press.

Falkowski P.G., Katz M.E., Knoll A.H., Quigg A., Raven J.A., Schofield O., Taylor F.J. (2004). "The evolution of modern eukaryotic phytoplankton." Science. 305(5682):354-60.

Falkowski P.G., Raven J.A. (2007). "Aquatic Photosynthesis." Second edition. New Jersey 08540 USA: Princeton University Press. ISBN: 9780691115511

Fehrmann C., Pohl P. (1993). "Cadmium adsorption by the non-living biomass of microalgae grown in axenic mass culture." J. Appl. Phycol. 5(6):555-562.

Filisetti-Cozzi T.M., Carpita N.C. (1991). "Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars." Anal. Biochem. 197(1):157-62.

Finn R.D., Tate J., Mistry J., Coggill P.C., Sammut S.J., Hotz H.R., Ceric G., Forslund K., Eddy S.R., Sonnhammer E.L.L., Bateman A. (2008). "The Pfam protein families database." Nucleic Acids Res. 36(suppl 1):D281-D288.

Fischer D., Schlösser U.G., Pohl P. (1997). "Exopolysaccharide production by cyanobacteria grown in closed photobioreactors and immobilized using white cotton towelling." J. Appl. Phycol. 9(3):205-213.

Flemming H.-C. (1995). "Biofouling und Biokorrosion — die Folgen unerwünschter Biofilme." Chem. Ing. Tech. 67(11):1425-1430.

Flemming H.C. (2002). "Biofouling in water systems--cases, causes and countermeasures." Appl. Microbiol. Biotechnol. 59(6):629-40.

Flemming H.C., Neu T.R., Wozniak D.J. (2007). "The EPS matrix: the "house of biofilm cells"." J. Bacteriol. 189(22):7945-7.

Flemming H.C., Wingender J. (2010). "The biofilm matrix." Nat. Rev. Microbiol. 8(9):623-33.

Fogg G.E. (1965). "Algal cultures and phytoplankton ecology." Univ of Wisconsin Press.

Friedman L., Kolter R. (2004). "Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms." Mol. Microbiol. 51(3):675-90.

Frølund B., Palmgren R., Keiding K., Nielsen P.H. (1996). "Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin." Water Res. 30(8):1749-1758.

Gälli R. (1987). "Biodegradation of dichloromethane in waste water using a fluidized bed bioreactor." Appl. Microbiol. Biotechnol. 27(2):206-213.

Galloway W.R., Hodgkinson J.T., Bowden S.D., Welch M., Spring D.R. (2011). "Quorum sensing in Gram-negative bacteria: small-molecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways." Chem. Rev. 111(1):28-67.

Galperin M.Y., Nikolskaya A.N., Koonin E.V. (2001). "Novel domains of the prokaryotic twocomponent signal transduction systems." FEMS Microbiol. Lett. 203(1):11-21.

Gehr R., Henry J.G. (1983). "Removal of extracellular material techniques and pitfalls." Water Res. 17(12):1743-1748.

Gibson D.T., Parales R.E. (2000). "Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology." Curr. Opin. Biotechnol. 11(3):236-243.

Giovannoni S.J. (2012). "Vitamins in the sea." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 109(35):13888-13889.

Gjermansen M., Ragas P., Tolker-Nielsen T. (2006). "Proteins with GGDEF and EAL domains regulate *Pseudomonas putida* biofilm formation and dispersal." FEMS Microbiol. Lett. 265(2):215-24.

Goller C., Wang X., Itoh Y., Romeo T. (2006). "The cation-responsive protein NhaR of *Escherichia coli* activates pgaABCD transcription, required for production of the biofilm adhesin poly-beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine." J. Bacteriol. 188(23):8022-32.

Gomez-Alvarez V., Revetta R.P., Santo Domingo J.W. (2012). "Metagenome analyses of corroded concrete wastewater pipe biofilms reveal a complex microbial system." BMC Microbiol. 12:12-122.

Gouveia L., Oliveira A. (2009). "Microalgae as a raw material for biofuels production." J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 36(2):269-274.

Gouveia L., Velosoa V., Reisb A., Fernandesb H., Novaisa J., Empis J. (1996). "Evolution of pigment composition in *Chlorella vulgaris*." Bioresour. Technol. 57(2):157–159, 161–163.

Gouveia L., Gomesb E., Empisc J. (1997). "Use of *Chlorella vulgaris* in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, Diets to Enhance Muscle Pigmentation." J. Appl. Aquac. 7(2):61-70.

Gu J.D. (2003) "Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances." Int. Biodeter. Biodegr. 52(2):69-91.

Hanahan D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." J. Mol. Biol. 166(4):557-80.

Handelsman J. (2004). "Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms." Microbiol. Mol. Biol. Rev. 68(4):669-685.

Hara A., Radin N.S. (1978). "Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent." Anal. Biochem. 90(1):420-6.

Haugo A.J., Watnick P.I. (2002). "*Vibrio cholerae* CytR is a repressor of biofilm development." Mol. Microbiol. 45(2):471-83. Hazan Z., Zumeris ., Jacob H., Raskin H., Kratysh G., Vishnia M., Dror N., Barliya T., Mandel M., Lavie G. (2006). "Effective Prevention of Microbial Biofilm Formation on Medical Devices by Low-Energy Surface Acoustic Waves." Antimicrob. Agents Ch. 50(12):4144-4152.

Heeb S., Haas D. (2001). "Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria." Mol. Plant Microbe. Interact. 14(12):1351-63.

Helliwell K.E., Wheeler G.L., Leptos K.C., Goldstein R.E., Smith A.G. (2011). "Insights into the Evolution of Vitamin B12 Auxotrophy from Sequenced Algal Genomes." Mol. Biol. Evol. 28(10):2921-2933.

Heuer H., Smalla K. (1997). "Application of denaturing gradient gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis for studying soil microbial communities." Modern Soil Microbiology. Marcel Dekker, New York: 353-373.

Hickman J.W., Tifrea D.F., Harwood C.S. (2005). "A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 102(40):14422-7.

Higgins M., Novak J. (1997). "Characterization of Exocellular Protein and Its Role in Bioflocculation." J. Environ. Eng. 123(5):479-485.

Hindersin S., Leupold M., Kerner M., Hanelt D. (2013). "Irradiance optimization of outdoor microalgal cultures using solar tracked photobioreactors." Bioprocess. Biosyst. Eng. 36(3):345-355.

Hoffman L.R., D'Argenio D.A., MacCoss M.J., Zhang Z., Jones R.A., Miller S.I. (2005). "Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation." Nature. 436(7054):1171-5.

Hoffman M., Decho A.W. (1999). "Extracellular enzymes within microbial biofilms and the role of the extracellular polymer matrix." In Microbial extracellular polymeric substances (pp. 217-230). Springer Berlin Heidelberg.

Hugenholtz P., Goebel B.M., Pace N.R. (1998). "Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity." J. Bacteriol. 180(18):4765-74.

Hugenholtz P., Hooper S.D., Kyrpides N.C. (2009). "Focus: synergistetes." Environ. Microbiol. 11(6):1327-1329.

Hulatt C.J., Thomas D.N. (2011). "Energy efficiency of an outdoor microalgal photobioreactor sited at mid-temperate latitude." Bioresour. Technol. 102(12):6687-95.

Hung D.T., Zhu J., Sturtevant D., Mekalanos J.J. (2006). "Bile acids stimulate biofilm formation in *Vibrio cholerae*." Mol. Microbiol. 59(1):193-201.

Jaeger K.E., Dijkstra B.W., Reetz M.T. (1999). "Bacterial biocatalysts: molecular biology, threedimensional structures, and biotechnological applications of lipases." Annu. Rev. Microbiol. 53:315-51.

Jahn A., Nielsen P.H. (1995). "Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from biofilms using a cation exchange resin." Water Sci. Technol. 32(8):157-164.

Jander F. (2001). "Massenkultur von Mikroalgen mit pharmazeutisch nutzbaren Inhaltsstoffen unter Verwendung von CO₂ und NaHCO₃, gewonnen aus den Abgasen eines Blockheizkraftwerkes." Kiel: Christian-Albrechts-Universität Kiel.

Janse I., Zwart G., Van der Maarel M., Gottschal J.C. (2000). "Composition of the bacterial community degrading *Phaeocystis* mucopolysaccharides in enrichment cultures." Aquat. Microb. Ecol. 22(2):119-133.

Jansen B., Kohnen W. (1995). "Prevention of biofilm formation by polymer modification." J. Ind. Microbiol. 15(4):391-396.

Jones D.S., Albrecht H.L., Dawson K.S., Schaperdoth I., Freeman K.H., Pi Y., Pearson A., Macalady J.L. (2012). "Community genomic analysis of an extremely acidophilic sulfur-oxidizing biofilm." ISME J. 6:158-70.

Joux F., Lebaron P. (2000). "Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level." Microb. Infect. 2(12):1523-35.

Jubelin G., Vianney A., Beloin C., Ghigo J.M., Lazzaroni J.C., Lejeune P. Dorel C. (2005). "CpxR/OmpR interplay regulates curli gene expression in response to osmolarity in *Escherichia coli*." J. Bacteriol. 187(6):2038-49.

Jurgenson C.T., Begley T.P., Ealick S.E. (2009). "The structural and biochemical foundations of thiamin biosynthesis." Annu. Rev. Biochem. 78:569-603.

Kaeberlein T., Lewis K., Epstein S.S. (2002). "Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment." Science. 296(5570):1127-9.

Kanehisa M., S., Goto S., Kawashima S., Okuno Y., Hattori M. (2004). "The KEGG resource for deciphering the genome." Nucleic Acids Res. 32(Database issue):D277-80.

Kapfhammer D., Karatan E., Pflughoeft K.J., Watnick P.I. (2005). "Role for glycine betaine transport in *Vibrio cholerae* osmoadaptation and biofilm formation within microbial communities." Appl. Environ. Microbiol. 71(7):3840-7.

Karatan E., Duncan T.R., Watnick P.I. (2005). "NspS, a predicted polyamine sensor, mediates activation of *Vibrio cholerae* biofilm formation by norspermidine." J. Bacteriol. 187(21):7434-43.

Karatan E., Watnick P. (2009). "Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms." Microbiol. Mol. Biol. Rev. 73(2):310-47.

Kasana R.C., Salwan R., Dhar H., Dutt S., Gulati A. (2008). "A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine." Curr. Microbiol. 57(5):503-7.

Kay R.A. (1991). "Microalgae as food and supplement." Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 30(6):555-573

Kennedy A.F., Sutherland I.W. (1987). "Analysis of bacterial exopolysaccharides." Biotechnol. Appl. Bioc. 9(1):12-19.

Keshtacher-Liebso E., Hadar Y., Chen Y. (1995). "Oligotrophic Bacteria Enhance Algal Growth under Iron-Deficient Conditions." Appl. Environ. Microbiol. 61(6):2439-41.

Kierek K., Watnick P.I. (2003). "Environmental determinants of *Vibrio cholerae* biofilm development." Appl. Environ. Microbiol. 69(9):5079-88.

King G.A. (1980). "Evolution of the coenzymes." Biosystems. 13(1-2):23-45.

King G.M. (2003). "Molecular and Culture-Based Analyses of Aerobic Carbon Monoxide Oxidizer Diversity." Appl. Environ. Microbiol. 69(12):7257-7265.

Kirchman D.L. (2012). "Processes in microbial ecology." Oxford University Press.

Kirov S.M., Castrisios M., Shaw J.G. (2004). "*Aeromonas* flagella (polar and lateral) are enterocyte adhesins that contribute to biofilm formation on surfaces." Infect. Immun. 72(4):1939-45.

Klappenbach J.A., Dunbar J.M., Schmidt T.M. (2000). "rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria." Appl. Environ. Microbiol. 66(4):1328-1333.

Klausen M., Gjermansen M., Kreft J.U., Tolker-Nielsen T. (2006). "Dynamics of development and dispersal in sessile microbial communities: examples from *Pseudomonas aeruginosa and Pseudomonas putida* model biofilms." FEMS Microbiol. Lett. 261(1):1-11.

Klindworth A., Pruesse E., Schweer T., Peplies J., Quast C., Horn M., Glockner F.O. (2012). "Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies." Nucleic Acids Res. 41(1): e1.

Konaklieva M.I., Plotkin B.J. (2006). "Chemical Communication-Do We Have a Quorum?" Mini-Rev. Med. Chem. 6(7):817-825.

Krohn-Molt I., Wemheuer B., Alawi M., Poehlein A., Güllert S., Schmeisser C., Pommerening-Röser A., Grundhoff A., Daniel R., Hanelt D., Streit W.R. (2013). "Metagenome survey of a multispecies and alga-associated biofilm revealed key elements of bacterial-algal interactions in photobioreactors." Appl. Environ. Microbiol. 79(20):6196-206.

Krohn I. (2010). "Molekulare und ökophysiologische Charakterisierung bakterieller Populationen in Fließgewässern." Diplomarbeit. Hamburg, Universität Hamburg.

Kuchma S.L., Brothers K.M., Merritt J.H., Liberati N.T., Ausubel F.M., O'Toole G.A. (2007). "BifA, a cyclic-Di-GMP phosphodiesterase, inversely regulates biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14." J. Bacteriol. 189(22):8165-78.

Kuczynski J., Stombaugh J., Walters W.A., Gonzalez A., Caporaso J.G., Knight R. (2011). "Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from microbial communities." Curr. Protoc. Bioinformatics. 10:10-7.

Lakaniemi A.M., Hulatt C.J., Wakeman K.D., Thomas D.N., Puhakka J.A. (2012). "Eukaryotic and prokaryotic microbial communities during microalgal biomass production." Bioresour. Technol. 124:387-393.

Lakaniemi A.M., Intihar V.M., Tuovinen O.H., Puhakka J.A. (2012). "Growth of *Dunaliella tertiolecta* and associated bacteria in photobioreactors." J. Ind. Microbiol. Biotechnology. 39(9):1357-1365.

Lakaniemi A.M., Intihar V.M., Tuovinen O.H., Puhakka J.A. (2011). "Growth of *Chlorella vulgaris* and associated bacteria in photobioreactors." Microb. Biotechnol. 5(1):69-78.

Lane D.J. (1991). "16S/23S rRNA sequencing." in Nucleic acid techniques in bacterial systematics, E. Stackebrandt and M.D. Goodfellow, Editors. John Wiley and Sons: New York, NY. p. 115-175.

Lapouge K., Schubert M., Allain F.H., Haas D. (2008). "Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour." Mol. Microbiol. 67(2):241-53.

Larsson U., Hagström A. (1979). "Phytoplankton exudate release as an energy source for the growth of pelagic bacteria." Mar. Biol. 52(3):199-206.

LaSarre B., Federle M.J. (2013). "Exploiting Quorum Sensing To Confuse Bacterial Pathogens." Microbiol. Mol. Biol. Rev. 77(1):73-111.

Laue H., Schenk A., Li H., Lambertsen L., Neu T.R., Molin S., Ullrich M.S. (2006). "Contribution of alginate and levan production to biofilm formation by *Pseudomonas syringae*." Microbiology. 152(10):2909-18.

Lee J., Jayaraman A., Wood T. (2007). "Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA." BMC Microbiol. 7(1):42.

Lee V.T., Matewish J.M., Kessler J.L., Hyodo M., Hayakawa Y., Lory S. (2007). "A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production." Mol. Microbiol. 65(6):1474-84.

Lee Y.K. (2001). "Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential." J. Appl. Phycol. 13(4):307-315.

Lehr F., Posten C. (2009). "Closed photo-bioreactors as tools for biofuel production." Curr. Opin. Biotechnol. 20(3):280-285.

Lewin A., Wentzel A., Valla S. (2012). "Metagenomics of microbial life in extreme temperature environments." Curr. Opin. Biotechnol. 24:doi:10.1016/j.copbio.2012.10.012.

Liesack W., Janssen P.H., Rainey F.A., Ward-Rainey N.L., Stackebrandt E. (1997). "Microbial diversity in soil: the need for a combined approach using molecular and cultivation techniques." In J. D. Van Elsas, J. T. Trevors und E. M. H. Wellington (Hrsg.), Modern soil microbiology. Marcel Dekker, Inc., New York

Lin S., Cronan J.E. (2011). "Closing in on complete pathways of biotin biosynthesis." Mol. Biosyst. 7(6):1811-21.

Lin Y.H., Xu J.L., Hu J., Wang L.H., Ong S.L., Leadbetter J.R., Zhang L.H. (2003). "Acylhomoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes." Mol. Microbiol. 47(3):849-60.

Liu H., Fang H.H.P. (2002). "Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges." J. Biotechnol. 95(3):249-256.

Lobas D., Nimtz M., Wray V., Schumpe A., Proppe C., Deckwer W.D. (1994). "Structure and physical properties of the extracellular polysaccharide PS-P4 produced by *Sphingomonas paucimobilis* P4 (DSM 6418)." Carbohydr. Res. 251:303-313.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J. Biol. Chem. 193(1):265-75.

Macur R.E., Wheeler J.T., McDermott T.R., Inskeep W.P. (2001). "Microbial populations associated with the reduction and enhanced mobilization of arsenic in mine tailings." Environ. Sci. Technol. 35(18):3676-82.

Madigan M.T., Martinko J.M., Dunlap P.V., Clark D.P. (2008). "Brock Biology of microorganisms" 12th edn. International Microbiology. 11:65-73.

Marmur J. (1961). "A procedure for the isolation of desoxyribonucleic acid from microorganism." J. Mol. Biol. 3:208-218.

Martens J., Barg H., Warren M.J., Jahn D. (2002). "Microbial production of vitamin B12." Appl. Microbiol. Biotechnol. 58(3):275-285.

Mata T.M., Martins A.A., Caetano N.S. (2010). "Microalgae for biodiesel production and other applications: a review" Renew. Sustain. Energ. Rev. 14(1):217-232.

Matthysse A.G., Yarnall H.A., Young N. (1996). "Requirement for genes with homology to ABC transport systems for attachment and virulence of *Agrobacterium tumefaciens*." J. Bacteriol. 178(17):5302-8.

Mattick J.S. (2002). "Type IV pili and twitching motility." Annu. Rev. Microbiol. 56:289-314.

McBride M.J., Xie G., Martens E.C., Lapidus A., Henrissat B., Rhodes R.G., Goltsman E., Wang W., Xu J., Hunnicutt D.W., Staroscik A.M., Hoover T.R., Cheng Y.Q., Stein J.L. (2009). "Novel features of the polysaccharide-digesting gliding bacterium *Flavobacterium johnsoniae* as revealed by genome sequence analysis." Appl. Environ. Microbiol. 75(21):6864-75. doi:10.1128/AEM.01495-09.

Mei G.Y., Yan X.X., Turak A., Luo Z.Q., Zhang L.Q. (2010). "AidH, an alpha/beta-hydrolase fold family member from an *Ochrobactrum* sp. strain, is a novel N-acylhomoserine lactonase." Appl. Environ. Microbiol. 76(15):4933-42. doi:10.1128/AEM.00477-10.

Meiron T.S., Saguy I.S. (2007). "Adhesion Modeling on Rough Low Linear Density Polyethylene." J. Food Sci. 72(9):E485-E491.

Mey A.R., Craig S.A., Payne S.M. (2005). "Characterization of *Vibrio cholerae* RyhB: the RyhB regulon and role of ryhB in biofilm formation." Infect. Immun. 73(9):5706-19.

Meyer O., Frunzke K., Gadkari D., Jacobitz S., Hugendieck I., Kraut M. (1990). "Utilization of carbon monoxide by aerobes: recent advances." FEMS Microbiol. Lett. 87(3-4):253-260.

Meyer O., Jacobitz S., Krüger B. (1986). "Biochemistry and physiology of aerobic carbon monoxide-utilizing bacteria." FEMS Microbiol. Lett. 39(3):161-179.

Mikx F.H., Van der Hoeven J.S. (1975). "Symbiosis of *Streptococcus mutans* and *Veillonella alcalescens* in mixed continuous cultures." Arch. Oral. Biol. 20(7):407-10.

Miller M.B., Bassler B.L. (2001). "Quorum sensing in bacteria." Annu. Rev. Microbiol. 55:165-99.

Miller S.T., Xavier K.B., Campagna S.R., Taga M.E., Semmelhack M.F., Bassler B.L., Hughson F.M. (2004). "*Salmonella typhimurium* recognizes a chemically distinct form of the bacterial quorum-sensing signal AI-2." Mol. Cell. 15(5):677-87.

Mittelman M.W. (1998). "Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations." J. Dairy Sci. 81(10):2760-2764.

Moelling C., Oberschlacke R., Ward P., Karijolich J., Borisova K., Bjelos N., Bergeron L. (2007). "Metal-dependent repression of siderophore and biofilm formation in *Actinomyces naeslundii*." FEMS Microbiol. Lett. 275(2):214-20.

Monds R.D., O'Toole G.A. (2009). "The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review." Trends Microbiol. 17(2):73-87.

Moorthy S., Watnick P.I. (2005). "Identification of novel stage-specific genetic requirements through whole genome transcription profiling of *Vibrio cholerae* biofilm development." Mol. Microbiol. 57(6):1623-35.

Morweiser M., Kruse O., Hankamer B., Posten C. (2010). "Developments and perspectives of photobioreactors for biofuel production." Appl. Microbiol. Biotechnol. 87(4):1291-301.

Mouget J.L., Dakhama A., Lavoie M.C., de la Noüe J. (1995). "Algal growth enhancement by bacteria: Is consumption of photosynthetic oxygen involved?" FEMS Microbiol. Ecol. 18(1):35-43.

Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold. Spring. Harb. Symp. Quant. Biol. 51(1):263-73.

Mullis K.B., Faloona F.A. (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." Methods Enzymol. 155:335-50.

Münster U., Chróst R.J. (1990). "Origin, composition, and microbial utilization of dissolved organic matter." In Aquat. Microb. Ecol. (pp. 8-46). Springer New York.

Muyzer G. (1999). "DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems." Curr. Opin. Microbiol. 2(3):317-322.

Muyzer G., Smalla K. (1998). "Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology." Anton. Leeuw. Int. J. G. 73(1):127-41.

Nakaya A., Katayama T., Itoh M., Hiranuka K., Kawashima S., Moriya Y., Okuda S., Tanaka M., Tokimatsu T., Yamanishi Y., Yoshizawa A.C., Kanehisa M., Goto S. (2013). "KEGG OC: a large-scale automatic construction of taxonomy-based ortholog clusters." Nucleic Acids Res. 41(D1):353 357.

Newell P.D., Boyd C.D., Sondermann H., O'Toole G.A. (2011). "A c-di-GMP Effector System Controls Cell Adhesion by Inside-Out Signaling and Surface Protein Cleavage." PLoS Biol. 9(2):e1000587.

Nichols D., Lewis K., Orjala J., Mo S., Ortenberg R., O'Connor P., Zhao C., Vouros P., Kaeberlein T., Epstein S.S. (2008). "Short Peptide Induces an "Uncultivable" Microorganism To Grow In Vitro " Appl. Environ. Microbiol. 74(15):4889-4897.

Nielsen P.H., Jahn A. (1999). "Extraction of EPS." In Microbial extracellular polymeric substances (pp. 49-72). Springer Berlin Heidelberg.

Nielsen P.H. Jahn A., Palmgren R. (1997). "Conceptual model for production and composition of exopolymers in biofilms." Water Sci. Technol. 36(1):11-19.

Novick R.P. (2003). "Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence." Mol. Microbiol. 48(6):1429-49.

O'Gara J.P. (2007). "ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*." FEMS Microbiol. Lett. 270(2):179-188.

O'Toole G.A. (2011). "Microtiter dish biofilm formation assay." JoVE. 47:doi:10.3791/2437.

O'Toole G.A., Kolter R. (1998). "Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development." Mol. Microbiol. 30(2):295-304.

Ogata H., Goto S., Sato K., Fujibuchi W., Bono H., Kanehisa M. (1999). "KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes." Nucleic Acids Res. 27(1):29-34.

Okada N., Hadioetomo R.S., Nikkuni S., Katoh K., Ohta T. (1983). "Vitamin B12 content of fermented foods in the tropics." Rep. Natl. Food Res. Inst. 43:126-129.

Otsuka S., Abe Y., Fukui R., Nishiyama M., Sendoo K. (2008). "Presence of previously undescribed bacterial taxa in non-axenic *Chlorella* cultures." J. Gen. Appl. Microbiol. 54(4):187-193.

Patel C.N., Wortham B.W., Lines J.L., Fetherston J.D., Perry R.D., Oliveira M.A. (2006). "Polyamines are essential for the formation of plague biofilm." J. Bacteriol. 188(7):2355-63.

Perez-Pantoja D., Donoso R., Agullo L., Cordova M., Seeger M., Pieper D.H., Gonzalez B. (2012). "Genomic analysis of the potential for aromatic compounds biodegradation in Burkholderiales." Environ. Microbiol. 14(5):1091-117.doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02613.x.

Pernthaler A., Pernthaler J., Amann R. (2002). "Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria." Appl. Environ. Microbiol. 68(6):3094-101.

Pernthaler J., Amann R. (2005). "Fate of heterotrophic microbes in pelagic habitats: focus on populations." Microbiol. Mol. Biol. Rev. 69(3):440-61.

Provasoli L., Carlucci A.F. (1974). "Vitamins and growth regulators" p. 741-787. In W. D. P. Stewart (ed.), Algal physiology and biochemistry. Blackwell Scientific Publications, Oxford, United Kingdom.

Pulz, O., Gross W. (2004). "Valuable products from biotechnology of microalgae." Appl. Microbiol. Biotechnol. 65(6):635-648.

Purevdorj B., Costerton J.W., Stoodley P. (2002). "Influence of hydrodynamics and cell signaling on the structure and behavior of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." Appl. Environ. Microbiol. 68(9):4457-64.

Richmond A. (Ed.) (2008). "Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology" John Wiley & Sons.

Riesenfeld C.S., Schloss P.D., Handelsman J. (2004). "Metagenomics: genomic analysis of microbial communities." Annu. Rev. Genet. 38:525-552.

Roth J.R., Lawrence J.G., Bobik T.A. (1996). "Cobalamin (coenzyme B12): synthesis and biological significance." Annu. Rev. Microbiol. 50(1):137-181.

Sand W., Gehrke T. (2006). "Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/bio-corrosion via interfacial processes involving iron(III) ions and acidophilic bacteria." Res. Microbiol. 157(1):49-56.

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 74(12):5463-7.

Schäfer H., Abbas B., Witte H., Muyzer G. (2002). "Genetic diversity of 'satellite' bacteria present in cultures of marine diatoms." FEMS Microbiol. Ecol. 42(1):25-35.

Schmeisser C., Stöckigt C., Raasch C., Wingender J., Timmis K.N., Wenderoth D.F., Flemming H.C., Liesegang H., Schmitz R.A., Jaeger K.E., Streit W.R. (2003). "Metagenome Survey of Biofilms in Drinking-Water Networks." Appl. Environ. Microbiol. 69:7298-7309.

Schmeisser C. (2004). Doktorarbeit. "Metagenomanalyse eines Multispezies-Biofilms: Biochemische Charakterisierung und Kristallisierung der ersten multimeren Esterase aus einem bisher nicht kultivierten Mikroorganismus." Georg-August-University Goettingen.

Schopf J.W., Hayes J.M., Walter M.R. (1983). "Evolution on earth's earliest ecosystems: recent progress and unsolved problems" In: J.W.Schopf: Earth's earliest biosphere. New Jersey, Princeton Univ. Press.

Schowen R. (1998). "Thiamine-dependent enzymes." p. 217-266. In M. Sinnott (ed.), Comprehensive biological catalysis, vol. 2. Academic Press, San Diego, Calif.

Scott S.A., Davey M.P., Dennis J.S., Horst I., Howe C.J., Lea-Smith D.J., Smith A.G. (2010). "Biodiesel from algae: challenges and prospects." Curr. Opin. Biotechnol. 21(3):277-286.

Shemesh M., Tam A., Steinberg D. (2007). "Expression of biofilm-associated genes of *Streptococcus mutans* in response to glucose and sucrose." J. Med. Microbiol. 56(11):1528-35.

Shendure J., Ji H. (2008). "Next-generation DNA sequencing." Nat. Biotechnol. 26(10):1135-1145.

Sigler W.V., Miniaci C., Zeyer J. (2004). "Electrophoresis time impacts the denaturing gradient gel electrophoresis-based assessment of bacterial community structure." J. Microbiol. Meth. 57(1):17-22.

Simm R., Morr M., Kader A., Nimtz M., Romling U. (2004). "GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility." Mol. Microbiol. 53(4):1123-34.

Simon C., Daniel R. (2009). "Achievements and new knowledge unraveled by metagenomic approaches." Appl. Microbiol. Biotechnol. 85(2):265-276.

Simon C., Daniel R. (2011). "Metagenomic Analyses: Past and Future Trends." Appl. Environ. Microbiol. 77(4):1153-1161.

Simon C., Wiezer A., Strittmatter A.W., Daniel R. (2009). "Phylogenetic diversity and metabolic potential revealed in a glacier ice metagenome." Appl. Environ. Microbiol. 75(23):7519-7526.

Singh P.K., Parsek M.R., Greenberg E.P., Welsh M.J. (2002). "A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development." Nature. 417(6888):552-5.

Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." Anal. Biochem. 150(1):76-85.

Sonnhammer E.L., Eddy S.R., Durbin R. (1997). "Pfam: a comprehensive database of protein domain families based on seed alignments." Proteins. 28(3):405-20.

Späth R., Wuertz S. (2000): "Extraction and quantification of extracellular polymeric substances from wastewater." In: Flemming, H.-C., Szewzyk U., Griebe T. (Hrsg.): Biofilms - Investigative Methods & Applications, S. 51-68, Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster. Stahl, D. A. and R. I. Aman (1991). Nucleic Acid Techniques in Bascterial Systematics. Chichester (UK), John Wiley and Sons.

Staley J.T., A. Konopka A. (1985). "Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats." Annu. Rev. Microbiol. 39:321-46.

Steele H.L., Streit W.R. (2005). "Metagenomics: advances in ecology and biotechnology." FEMS Microbiol Lett. 247(2):105-11.

Stewart P.S. (2003). "New ways to stop biofilm infections." Lancet. 361(9352):97.

Stewart P.S., Franklin M.J. (2008). "Physiological heterogeneity in biofilms." Nat. Rev. Microbiol. 6(3):199-210.

Stoodley P., Sauer K., Davies D.G., Costerton J.W. (2002). "Biofilms as complex differentiated communities." Annu. Rev. Microbiol. 56(1):187-209.

Streit W.R., Entcheva P. (2003). "Biotin in microbes, the genes involved in its biosynthesis, its biochemical role and perspectives for biotechnological production." Appl. Microbiol. Biotechnol. 61(1):21-31.

Streit W.R., Schmitz R.A. (2004). "Metagenomics–the key to the uncultured microbes." Curr. Opin. Microbiol. 7(5):492-498.

Sudarsan N., Lee E.R., Weinberg Z., Moy R.H., Kim J.N., Link K.H., Breaker R.R. (2008). "Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP." Science. 321(5887):411-3. doi:10.1126/science.1159519.

Sutherland I.W. (1988). "Bacterial surface polysaccharides: structure and function." Int. Rev. Cytol. 113:187-231.

Sutherland I.W. (2001). "The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment." Trends Microbiol. 9(5):222-7.

Suzuki M.T., Giovannoni S.J. (1996). "Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR." Appl. Environ. Microbiol. 62(2):625-30.

Szybalski W., Kim S.C., Hasan N., Podhajska A.J. (1991). "Class-IIS restriction enzymes--a review." Gene. 100:13-26.

Tabak M., Scher K., Hartog E., Romling U., Matthews K.R., Chikindas M.L., Yaron S. (2007). "Effect of triclosan on *Salmonella typhimurium* at different growth stages and in biofilms." FEMS Microbiol. Lett. 267(2):200-6.

Takeno M., Taguchi H., Akamatsu T. (2012). "Role of ComEA in DNA uptake during transformation of competent *Bacillus subtilis*." J. Biosci. Bioeng. 113(6):689-93.

Tamaki H., Sekiguchi Y., Hanada S., Nakamura K., Nomura N., Matsumura M., Kamagata Y. (2005). "Comparative analysis of bacterial diversity in freshwater sediment of a shallow eutrophic lake by molecular and improved cultivation-based techniques." Appl. Environ. Microbiol. 71(4):2162-9.

Tang Y.Z., Koch F., Gobler C.J. (2010). "Most harmful algal bloom species are vitamin B1 and B12 auxotrophs." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 107(48):20756-61.

Tatusov R.L., Koonin E.V., Lipman D.J. (1997). "A genomic perspective on protein families." Science. 278(5338):631-7.

Tatusov R.L., Natale D.A., Garkavtsev I.V., Tatusova T.A., Shankavaram U.T., Rao B.S., Kiryutin B., Galperin M.Y., Fedorova N.D., Koonin E.V. (2001). "The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes." Nucleic Acids Res. 29(1):22-28.

Thomas T., Gilbert J., Meyer F. (2012). "Metagenomics-a guide from sampling to data analysis." Microb. Inform. Exp. 2(3)

Tischler A.D., Camilli A. (2004). "Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation." Mol. Microbiol. 53(3):857-69.

Tremaroli V., Backhed F. (2012). "Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism." Nature. 489(7415):242-9.

Tringe S.G., Von Mering C., Kobayashi A., Salamov A.A., Chen K., Chang H.W., Podar M., Short J.M., Mathur E.J., Detter J.C., Bork P., Hugenholtz P., Rubin E.M. (2005). "Comparative metagenomics of microbial communities." Science. 308(5721):554-557.

Troch P., Philip-Hollingworth S., Orgambide G., Dazzo F.B., Vanderleyden J. (1992): "Analysis of extracellular polysaccharides isolated from *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains." Symbiosis. 13:229-241

Tsang P.H., Li G., Brun Y.V., Freund L.B., Tang J.X. (2006). "Adhesion of single bacterial cells in the micronewton range." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 103(15):5764-8.

Ude S., Arnold D.L., Moon C.D., Timms-Wilson T., Spiers A.J. (2006). "Biofilm formation and cellulose expression among diverse environmental *Pseudomonas* isolates." Environ. Microbiol. 8(11):1997-2011.

Ueda H., Otsuka S., Senoo K. (2009). "Community composition of bacteria co-cultivated with microalgae in non-axenic algal cultures." Microbiol. Cult. Coll. 25:21-25.

Ugwu C.U., Aoyagi H., Uchiyama H. (2008). "Photobioreactors for mass cultivation of algae." Bioresour. Technol. 99(10):4021-4028.

Uroz S., Chhabra S.R., Camara M., Williams P., Oger P., Dessaux Y. (2005). "N-Acylhomoserine lactone quorum-sensing molecules are modified and degraded by *Rhodococcus erythropolis* W2 by both amidolytic and novel oxidoreductase activities." Microbiology. 151(10):3313-22.

Uroz S., Oger P., Chhabra S.R., Camara M., Williams P., Dessaux Y. (2007). "N-acyl homoserine lactones are degraded via an amidolytic activity in *Comamonas* sp. strain D1." Arch. Microbiol. 187(3):249-56.

Vasilev K., Cook J., Griesser H.J. (2009). "Antibacterial surfaces for biomedical devices." Expert Rev. Med. Devic. 6(5): 553-567.

Velasquez-Orta S.B., Curtis T.P., Logan B.E. (2009). "Energy from algae using microbial fuel cells." Biotechnol. Bioeng. 103(6):1068-76.

Videla H.A., Characklis W.G. (1992) "Biofouling and microbially influenced corrosion." Int. Biodeter. Biodegr. 29(3):195-212.

Vuong C., Saenz H.L., Gotz F., Otto M. (2000). "Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*." J. Infect. Dis. 182(6):1688-93.

Wagner-Dobler I., Ballhausen B., Berger M., Brinkhoff T., Buchholz I., Bunk B., Cypionka H., Daniel R., Drepper T., Gerdts G., Hahnke S., Han C., Jahn D., Kalhoefer D., Kiss H., Klenk H.P., Kyrpides N., Liebl W., Liesegang H., Meincke L., Pati A., Petersen J., Piekarski T., Pommerenke C., Pradella S., Pukall R., Rabus R., Stackebrandt E., Thole S., Thompson L., Tielen P., Tomasch J., von Jan M., Wanphrut N., Wichels A., Zech H., Simon M. (2010). "The complete genome sequence of the algal symbiont *Dinoroseobacter shibae*: a hitchhiker's guide to life in the sea." ISME J. 4(1):61-77.

Warren M.J., Raux E., Schubert H.L., Escalante-Semerena J.C. (2002). "The biosynthesis of adenosylcobalamin (vitamin B12)." Nat. Prod. Rep. 19(4):390-412.

Watanabe K., Takihana N., Aoyagi H., Hanada S., Watanabe Y., Ohmura N., Saiki H., Tanaka H. (2005). "Symbiotic association in *Chlorella* culture." FEMS Microbiol. Ecol. 51(2):187-196.

Weinstock G.M. (2012). "Genomic approaches to studying the human microbiota." Nature. 489(7415):250-6.

Whitchurch C.B., Tolker-Nielsen T., Ragas P.C., Mattick J.S. (2002). "Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation." Science. 295(5559):1487.

Williams P.J.I.B., Laurens L.M.L. (2010). "Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics." Energ. Environ. Sci. 3(5):554-590.

Williams T.J., Wilkins D., Long E., Evans F., Demaere M.Z., Raftery M.J., Cavicchioli R. (2013). "The role of planktonic *Flavobacteria* in processing algal organic matter in coastal East Antarctica revealed using metagenomics and metaproteomics." Environ. Microbiol. 15(5):1302-17.

Williamson K.S., Richards L.A., Perez-Osorio A.C., Pitts B., McInnerney K., Stewart P., Franklin M.J. (2012). "Heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms includes expression of ribosome hibernation factors in the antibiotic-tolerant subpopulation and hypoxia-induced stress response in the metabolically active population." J. Bacteriol. 194(8):2062-73.

Wingender J., Strathmann M., Rode A., Leis A., Flemming H.C. (2001). "Isolation and biochemical characterization of extracellular polymeric substances from *Pseudomonas aeruginosa*." Methods Enzymol. 336:302-314.

Woese C.R. (1987). "Bacterial evolution." Microbiol.Rev. 51(2):221.

Wolter K. (1982). "Bacterial incorporation of organic substances released by natural phytoplankton populations." Mar. Ecol. Prog. Ser. 7(3):287-295.

Xavier J.B., Foster K.R. (2007). "Cooperation and conflict in microbial biofilms." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 104(3):876-81.

Xie G., Bruce D.C., Challacombe J.F., Chertkov O., Detter J.C., Gilna P., Han C.S., Lucas S., Misra M., Myers G.L., Richardson P., Tapia R., Thayer N., Thompson L.S., Brettin T.S., Henrissat B., Wilson D.B., McBride M.J. (2007). "Genome sequence of the cellulolytic gliding bacterium *Cytophaga hutchinsonii*." Appl. Environ. Microbiol. 73(11):3536-46.

Yabuuchi E., Kosako Y. (2005). Order IV. Sphingomonadales ord. nov. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn, vol. 2 (The Proteobacteria), part C (The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria), pp.230–233. Edited by D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley & G. M. Garrity. New York: Springer.

Yeates C., Gillings M.R., Davison A.D., Altavilla N., Veal D.A. (1998). "Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification." Biol. Proced. Online. 1(1):40-47.

Zerbino D.R., Birney E. (2008). "Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs." Genome Res. 18(5):821-829.

Zhang X., Bishop P.L. (2003). "Biodegradability of biofilm extracellular polymeric substances." Chemosphere. 50(1):63-69.

6 Anhang

6.1 Tagungsbeiträge

Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) (18.02. - 21.03.2012); "Microbial Biofilm Formation in Photobioreactors" (Poster)

14th International Symposium on Microbial Ecology (ISME 14) (19.08.-24.08.2012); "A metagenome analysis of photobioreactor associated biofilms reveals key elements of bacterial-algae interactions" (Poster)

ProcessNet-Jahrestagung und 30. DECHEMA- Jahrestagung der Biotechnologen 2012 (10.09.-13.09.2012); "Mikrobielle Biofilme - eine Herausforderung für Photobio-reaktoren?" (Poster)

Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) (10.03.-13.03.2013); "Who's there and what are they doing? - Analysis of the microbial composition and their potential functions in photobioreactors" (Poster)

6.2 Publikationen

Krohn-Molt I., Wemheuer B., Alawi M., Poehlein A., Güllert S., Schmeisser C., Pommerening-Roser A., Grundhoff A., Daniel R., Hanelt D., Streit WR. (2013). "Metagenome survey of a multispecies and algae-associated biofilm reveals key elements of bacterial-algae interactions in photobioreactors", Appl. Environ. Microbiol. 79(20):6196-206.

Hornung C., Poehlein A., Haack FS., Schmidt M., Dierking K., Pohlen A., Schulenburg H.,
Blokesch M., Plener L., Jung K., Bonge A., Krohn-Molt I., Utpatel C., Timmermann G.,
Spieck E., Pommerening-Roser A., Bode E., Bode HB., Daniel R., Schmeisser C., Streit W.R.
(2013). "The Janthinobacterium sp. HH01 genome encodes a homologue of the V.
cholerae CqsA and L. pneumophila LqsA autoinducer synthases", PLoS One.
8(2):e55045. doi: 10.1371/journal.pone.0055045.

October 2013 • Volume 79 • Number 20



published twice monthly by



Krohn-Molt et al. (2013). "Metagenome survey of a multispecies and alga-associated biofilm revealed key elements of bacterialalgal interactions in photobioreactors." Appl. Environ. Microbiol. 79(20):6196-206.

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. W. Streit bedanken, der mir in seiner Arbeitsgruppe diese Dissertationsarbeit ermöglichte und mich mit seinen Ratschlägen und hilfreichen Ideen, Anregungen und Kritik unterstützt hat. Sein Vertrauen in meine Fähigkeiten und die Freiräume, die er mir bei der Ausgestaltung des Themas gelassen hat, weiß ich sehr zu schätzen. Weiterhin möchte ich ihm für seine engagierte Interessenvertretung der Abteilung Mikrobiologie innerhalb der Universität Hamburg danken.

Herrn Prof. Dr. D. Hanelt möchte ich für die Bereitstellung der Thematik und für das Vertrauen danken, dass er in mich setzte an diesem anspruchsvollen und hochinteressanten Projekt zu arbeiten.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Mentor PD Dr. A. Pommerening-Röser für seinen fundierten Rat, die hilfreichen Gespräche und seine Unterstützung.

Dr. Mirjam Perner danke ich für ihr Engagement im Rahmen der Landesgraduiertenschule "C1-Chemistry in Resource and Energy Management"; die Mikrobiologie und andere naturwissenschaftliche Bereiche einander näher zu bringen.

Dr. Christel Vollstedt, Dr. Dagmar Krysciak und Dr. Eva Spieck danke ich für die wunderbare Leitung verschiedener Praktika innerhalb meines Studiums und dafür, dass sie bei mir das Interesse für die Mikrobiologie geweckt haben.

Außerdem bedanke ich mich bei allen DoktorandInnen der Abteilung Mikrobiologie und Biotechnologie der Universität Hamburg für die nette Zeit, die außerordentliche Hilfsbereitschaft und Kollegialität. Zu nennen sind hier: Katja, Boris, Nico, Nele, Jessica, Simon, Frederike, Moritz, Jennifer, Janine, Ulrich und viel andere mehr. Weiterhin möchte ich mich bei Stefan und Marco vom TERM-Projekt bedanken für die freundliche Einführung in die Photobioreaktortechnologie. Danke auch an all meine Bachelor- Master- und Diploma- Studenten für ihr reges Interesse an meiner Arbeit.

Darüber hinaus danke ich Dr. Gabriele Timmermann, Angela Jordan, Uschi Reinitz, Christiane Debus, Regina Liebram, Martina Schmidt und Sigrid Mörke für ihre freundliche Unterstützung in logistischen und technischen Belangen.

Die vorliegende Arbeit wurde von dem Projekt "Technologien zur Erschließung der Ressource Mikroalgen" (TERM) und dem BMBF-Projekt "ChemBiofilm" unterstützt, und wurde von der Landesgraduiertenschule "C1-Chemistry in Resource and Energy Management" gefördert (C1-REM, Hamburg, Deutschland). Für die bereitgestellten Mittel möchte ich mich an dieser Stelle bedanken.

Der größte Dank gilt meinem geliebten Ehemann, der mir im Laufe der Jahre immer verständnisvoll zur Seite stand; sowie meiner Mutter und meinen Freunden, die mich stets unterstützen. Danke für all die kleinen und großen Dinge die sich nicht in Worte fassen lassen. Ohne Euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.