

„Struktur und Funktion mikrobieller Populationen bei der Aufbereitung von Industrieabwasser“

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften
des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik,
Informatik und Naturwissenschaften,
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Ludmilla Lazer

geb. Pell

August 2017

Tag der Disputation: 27. Oktober 2017

Gutachter: Prof. Dr. Dieter Hanelt
Mitgutachter: PD Dr. Andreas Pommerening-Röser

I.	Inhaltsverzeichnis	
II.	Abkürzungsverzeichnis	
1.	Zusammenfassung / Summary	1
2.	Einleitung	5
3.	Material und Methoden	13
3.1	Mikroalgen und Belebtschlamm	13
3.2	Chemikalien	13
3.3	Mikrobiologische Methoden	13
3.3.1	Kultivierung der Mikroalge <i>Chlorella vulgaris minima</i>	13
3.3.2	Abwassermedien	14
3.3.3	Herstellung von R2A-Agarplatten	15
3.3.4	Bestimmung der Lebenszellzahl	15
3.4	Kultivierungstestsyste	15
3.4.1	Kultivierung von Algen-Bakterien-Flocken im Labor	15
3.4.2	Kultivierung von Algen-Bakterien-Flocken im Outdoorsystem	16
3.5	Molekularbiologische Methoden	18
3.5.1	Isolierung von DNA	18
3.5.2	Bestimmung der DNA-Konzentration und -Reinheit	18
3.5.3	Agarosegelelektrophorese	18
3.5.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	19
3.5.4.1	Aufreinigung von PCR-Produkten	20
3.6	Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE)	20
3.7	Ökophysiologische Untersuchungen	23
3.7.1	Nicht invasive Sauerstoffmessung	23
3.7.2	O₂-Mikrosensoren in Nadelbauweise	25
3.7.3	Puls-Amplituden-Modulation-Messung (PAM)	26
3.8	Desintegrationsassay für ALBA-Flocken	26
3.8.1	Desintegrationsmethoden	27
3.8.2	Bestimmung des Desintegrationsgrades	28
3.9	Quantifizierungsassay von ALBA-Flocken	29
3.9.1	MATLAB® Matrix	30
3.9.2	Vorbereitung der Mischprobe für die photometrische Quantifizierung	30
3.10	Physikalisch- und chemische Analysen	30
3.10.1	Nährstoffanalyse mittels Hach Lange Küvettentests	31

3.10.2	Isolierung von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) aus Algen-Bakterien-Flocken	31
3.10.3	Bestimmung von Proteinen	32
3.10.4	Bestimmung von Kohlenhydraten	33
3.10.5	Bestimmung des Gesamt-Lipidgehaltes	34
3.10.6	Bestimmung des Pigmentgehalts Chlorophyll a / b	34
3.10.7	Trockensubstanz (TS)	34
3.10.8	Optische Dichte (Extinktion)	35
3.11	Rasterelektronenmikroskopie	35
3.11.1	Behandlung der Zellen: Fixierung und Dehydrierung	35
3.11.2	Kritische- Punkt- Trocknung	36
3.11.3	Präparation und Bedampfung	37
3.12	Sequenzierung	37
3.13	Statistik	37
4.	Ergebnisse	38
4.1	Abwasserreinigung mittels Algen und Bakterien	38
4.1.1	Abwasserreinigung im Labormaßstab	39
4.1.2	Abwasserreinigung im Pilotmaßstab	45
4.2	Sauerstoffdynamik	63
4.2.1	Sauerstoff Charakteristika von <i>C. vulgaris</i>	63
4.2.2	Elektrontransport Charakteristika von <i>C. vulgaris</i>	66
4.3	Verhältnisbestimmung Mikroalgen zu Bakterien	68
4.3.1	Desintegrationsassay für ALBA-Flocken	69
4.3.2	Photometrische Quantifizierungsmethode	76
4.4	Anwendung	78
4.5	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen	85
5.	Diskussion	88
6.	Literaturverzeichnis	112
	Abbildungsverzeichnis	121
	Tabellenverzeichnis	124
	Anhang	125
	Eidesstattliche Erklärung	129

II. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALBA	Algen-Bakterien
α	initiale Steigung der Lichtsättigungskurve
ARA	Abwasserreinigungsanlage
bidest.	Bidestilliert
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf
CNP	Kohlenstoff-Stickstoff-Phosphor
ETR	Elektronentransportrate
ETR _{max}	maximale Elektronentransportrate
dest.	destilliert
DGGE	Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere
EtOH	Ethanol
g	gramm
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
h	Stunde (hora)
kb	Kilobasen
KBE	Koloniebildende Einheit
L	Liter
m	milli (10^{-3})
M	molar
MBBR	engl. „ <i>moving bed biofilm reactor</i> “
mg	Milligramm
μ	mikro (10^{-6})
μ g	mikrogramm
μ L	mikroliter

min	Minute
mL	milliliter
mm	millimeter
mM	millimolar
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	nanogramm
n.g.	nicht gemessen
nm	nanometer
OD	optische Dichte
PBR	Photobioreaktor
PCR	engl. „ <i>polymerase chain reaction</i> “
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PI	engl. „ <i>Photosynthesis-Irradiance</i> “
rpm	engl. „ <i>rounds per minute</i> “
RT	Raumtemperatur
RLC	Rapid Light Curve
Sek	Sekunde
sp.	Spezies
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TS	Trockensubstanz
u.v.m.	und vieles mehr
üN	über Nacht
V	Volt
Vol.	Volumen
W	Watt
z.B.	zum Beispiel

1. Zusammenfassung

Wasser wird in vielen Fertigungsverfahren, wie z.B. zur Papier-, Lebensmittel- oder Textilherstellung, als Rohstoff eingesetzt. Neben dem eigentlichen Fertigungsprodukt entstehen während der diversen Prozessstufen erhebliche Mengen an Abwasser, das vor der Einleitung in die entsprechenden Vorfluter gereinigt werden muss. Mit dem Ziel, den Reinigungsprozess so energieeffizient wie möglich zu gestalten, werden neben dem klassischen Belebtschlammverfahren alternative Technologien zur Abwasseraufbereitung, wie z.B. den Einsatz von Mikroalgen entwickelt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Interaktionen zwischen Mikroorganismenpopulationen in sogenannten Algen-Bakterien-Flocken (ALBA) im Detail untersucht, um einen Beitrag zur weiteren Optimierung der Prozesssteuerung in derartigen Kläranlagen zu leisten.

Es wurde die Reinigungskapazität von ALBA-Flocken in Papierfabrikabwasser im Labormaßstab und anschließend im Pilotmaßstab bestimmt. Der durchschnittliche Abbaugrad des chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) im Labormaßstab (2 L-Reaktor) lag bei ca. 76% und in den Pilotreaktoren (800 L-Reaktor 0,5 m hoch; 1600 L-Reaktor 1 m hoch) bei ca. 84%, wobei die Verweildauer des Abwassers im 800 L-Reaktor bei $4,01 \pm 2,20$ Tagen lag und die des 1600 L-Reaktors $7,74 \pm 2,42$ Tage betrug.

Die Bestimmung des Chlorophyllgehaltes in der ALBA-Biomasse und die Charakterisierung der extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) der Flocken ließen auf eine schnelle Inkorporation freier *Chlorella vulgaris*-Zellen mit dem Belebtschlamm und eine fortlaufende Stabilität der ALBA-Flocken schließen. Ebenfalls bestätigten rasterelektronmikroskopische Untersuchungen der ALBA-Flocken eine vielschichtige und verflochtene Struktur der beteiligten Mikroorganismen, die mit Hilfe von EPS ein stabiles Netzwerk aus Mikroalgen und Bakterien bildeten.

Erstmals wurde in der vorliegenden Arbeit die Dynamik der bakteriellen und eukaryotischen Populationen in einer ALBA-betriebenen Reinigungsanlage im Detail untersucht. Mittels Denaturierenden Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE) entstand ein erster Eindruck über die Veränderung in der Zusammensetzung innerhalb eines 15-wöchigen Versuchansatzes. Innerhalb der ersten sechs Wochen war die Populationsstruktur durch eine verhältnismäßige hohe Diversität gekennzeichnet. Die Diversität verringerte sich ab der sechsten Woche zu Gunsten zunehmender Abundanz bestimmter Leitorganismen. Zu den Leitorganismen zählten *Flavobacterium* sp., *Phaeodactylibacter luteus*, *Thiothrix eikelboomii*, *Novosphingobium resinovorum* sowie ein bisher nicht kultivierbarer Vertreter der Ordnung Sphingobacteriales. Innerhalb der Eukaryoten dominierten *Chlorella*, *Neocystis*,

Spermatozopsis, *Chlamydomonas* und ein unbekannter Cryptomycota-Vertreter. Hieraus wurde auf die Bildung einer stabilen ALBA-Biozönose geschlossen.

Entsprechende Populationsanalysen, bezogen auf die bakterielle Gemeinschaft, wurden mittels Hochdurchsatzsequenzierung analysiert. Diese Analysen wurden auf die 800 L Pilotanlage beschränkt und zu drei bestimmten Zeitpunkten (2., 8. und 15. Woche) durchgeführt. Zu allen drei Zeitpunkten der Analysen wurden dabei die Proteobacteria als dominierende Fraktion der bakteriellen Populationen identifiziert. Die Abundanz der Vertreter des Phylums Bacteroidetes, die überwiegend durch Vertreter der Klasse Sphingobacteria vertreten war, nahm stetig ab. Eine differenzierende Auswertung innerhalb des Phylums Proteobacteria zeigte, dass sich die Häufigkeit der detektierten Vertreter der Proteobacteria Klassen von Zeit zu Zeit änderte. Insbesondere in der 15. Woche dominierten Vertreter der Gattung *Thiotrix*.

Die Ergebnisse der Populationsdynamik beider Techniken geben einen detaillierten Einblick in die Veränderung der mikrobiellen Gemeinschaft und den putativen bakteriellen Stoffwechsellleistungen eines ALBA-Systems. Zudem wird verdeutlicht, dass eine Anpassung der Biozönose auf Änderungen in der Zusammensetzung des Abwassers stattfindet.

Vor dem Hintergrund, dass für eine effektive Abwasserreinigung die Sauerstoffproduktion durch die Mikroalgen für die Bakterien sichergestellt werden muss, wurden Untersuchungen zur Sauerstoffproduktionsrate der Mikroalge *C. vulgaris* bei unterschiedlicher Zelldichte durchgeführt. Diese ergaben einen optimalen Sauerstoffproduktionsbereich zwischen 0,2 bis 1 g L⁻¹ Trockensubstanz (TS) mit einer maximalen Produktionsrate von 0,3 bis 0,4 nmol O₂ mL⁻¹ s⁻¹. Zudem lag der Lichtsättigungspunkt in diesem TS-Bereich durchschnittlich bei 280 μmol Photonen m⁻² s⁻¹.

Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig eine photometrische Methode zur Quantifizierung der Populationen Algen und Bakterien in ALBA-Flocken aus der Abwasserreinigung zur Überwachung der Verhältnisse entwickelt und angewandt. Dabei wurde die Grundvoraussetzung für eine additive Superposition beider Absorptionsspektren von Mikroalgen und Bakterien ermittelt. Mit Hilfe von MATLAB® programmierter Modelle wurden die jeweiligen Konzentrationen von Algen und Bakterien berechnet und auf die Genauigkeit an mehreren Bioreaktoren getestet. Dabei erreichte das Modell der Koeffizientenmatrix 1 eine Präzision von 95,8% vom berechneten zum gemessenen TS-Gehalt. Für die photometrische Quantifizierungsmethode muss die zu untersuchende Probe homogen vorliegen. Zu diesem Zweck wurde eine schonende Desintegrationsmethode für kompakte ALBA-Flocken entwickelt (Pell et al., 2016), die auch für andere Anwendungen denkbar ist.

Summary

Water is used in numerous manufacturing processes as a resource for e.g. production of paper, food or textile. In addition to the main manufacturing product during the various processing stages, considerable amounts of wastewater are generated that must be purified before discharge into the corresponding receiving water. Beside the classical activated sludge treatment, alternative technologies for the wastewater treatment such as the use of microalgae for an energy-efficient purification process are currently under investigation.

The aim of the present work was the investigation of interactions between microorganism populations in algae-bacterial-flocs (ALBA) in order to contribute further optimizations of the process control in such sewage treatment plants.

The degradation performance of ALBA-flocs for papermill wastewater in the laboratory scale and subsequently at pilot scale was determined. The average removal efficiencies of chemical oxygen demand (COD) were in the laboratory scale (2 L reactor) approx. 76% and in the pilot plants (800 L reactor 0.5 m high and 1600 L reactor 1 m high) approx. 84%, the retention time of the effluent at the 0.5 m high reactor was 4.01 ± 2.20 days and at the 1 m high reactor 7.74 ± 2.42 days.

The determination of the chlorophyll content in the ALBA-biomass and the characterization of the extracellular polymeric substances (EPS) of the flocs concluded a rapid incorporation of free *Chlorella vulgaris* cells with the activated sludge and a continuous stability of the ALBA-flocs. Also the scanning electron microscopy (SEM) of the ALBA-flocs confirmed a complex structure of involved microorganisms, which was formed up by means of EPS a stable network of microalgae and bacteria.

For the first time, the dynamics of the bacterial and eukaryotic populations in an ALBA-plant was investigated elaborately. By denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), a first impression of changes in the composition within a 15-week experimental approach was obtained. Within the first six weeks, the population structure was characterized by a proportionate high diversity. The diversity decreased from the 6th week for the benefit of increasing abundance of certain indicator species. The organisms *Flavobacterium sp.*, *Phaeodactylibacter luteus*, *Thiothrix eikelboomii*, *Novosphingobium resinovorum* and a non-cultivable representative of the order Sphingobacteriales ranked among to indicator species. Within the eukaryotes *Chlorella*, *Neocystis*, *Spermatozopsis*, *Chlamydomonas* and an unknown representative of Cryptomycota dominated. This stable species occurrence has led to the formation of a stable ALBA biocenosis.

Corresponding to analyses of populations, relating to the bacterial community were investigated by high-throughput sequencing. These analyses were restricted to the 800 L pilot plant and were carried out at three specific time points (at week 2, 8 and 15). At all three time points Proteobacteria were identified as the dominant fraction of bacterial populations. The abundance of the representatives of the phylum Bacteroidetes, which was predominantly represented by representatives of the class Sphingobacteria, was constantly decreasing. A differentiating evaluation within the Phylum Proteobacteria showed that the abundance of the detected representatives of the Proteobacteria classes changed over time. The representatives of the genus *Thiotrix* dominated in the 15th week.

The results of the population dynamic of both techniques provide a detailed insight into the variation in the microbial community and the putative bacterial metabolic activity of an ALBA system. An adaptation of a specific biocenosis was observed when the composition of the wastewater changed.

Regarding the fact that the oxygen production of the microalgae for the bacteria must be ensured for an effective wastewater treatment, investigations on the oxygen production rate of *C. vulgaris* at different cell densities were performed. The range between 0.2 to 1.0 g L⁻¹ of cell dry weight (CDW) reached max. oxygen production rates of 0.3 to 0.4 nmol O₂ mL⁻¹ s⁻¹. The light saturation point at this CDW range was on average 280 μmol photons m⁻² s⁻¹.

Furthermore, a photometric method for the quantification of the concentration of algae and bacteria in ALBA-flocs from wastewater treatment was developed and applied for the monitoring of the fractions. The basic prerequisite for an additive superposition of both absorption spectra of microalgae and bacteria was observed. Programmed models were developed by means of MATLAB®. The respective concentrations of algae and bacteria were calculated and tested for accuracy in several bioreactors. The model of the coefficient matrix 1 achieved a precision of 95.8% from the calculated to the measured CDW content. To operate the photometric quantification method, samples have to be homogeneous. For this purpose, a mild disintegration method has been developed for stable ALBA-flocs (Pell et al., 2016), that can also be used for other applications.

2. Einleitung

Zu den Mikroalgen zählen ein- oder wenigzellige, phototrophe Mikroorganismen, die in der Regel in aquatischen Lebensräumen angesiedelt sind. Sie gewinnen ihre Energie durch oxygene Photosynthese und wachsen generell autotroph. Im Vergleich zu Makroalgen und den grünen Pflanzen sind Mikroalgen durch ein höheres Oberflächen-Volumen-Verhältnis charakterisiert. Hieraus lässt sich ihre relativ hohe Photosyntheseleistung ableiten. Sie gelten deshalb als die entscheidenden Sauerstoffproduzenten in den Meeren (Field et al., 1998). Neben ihrer ökologischen Bedeutung stehen Mikroalgen insbesondere wegen ihrer vielfältigen technischen Einsatzmöglichkeiten sowie ihres ökonomischen Potenzials zunehmend im Mittelpunkt des Interesses. Das Anwendungsspektrum reicht von Lebens- und Futtermittel über Biokraftstoff- bis hin zu pharmazeutischen Produkten. Hier werden vor allem ihre wertvollen Inhaltsstoffe genutzt. Wegen der bereits erwähnten hohen Photosyntheseleistung gewinnen Mikroalgen ebenso in der biologischen Abwasserreinigung an Bedeutung. Hierbei werden bevorzugt grüne Mikroalgen eingesetzt. So verfügt die unizelluläre, unbewegliche und kugelförmige Mikroalge *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta), die zur Klasse der Trebouxiophyceae gehört, über großes Potenzial sowohl als kommerzieller biologischer Energieträger oder als Nahrungsmittel als auch in der Abwasserreinigung. Sie besitzt die Pigmente Chlorophyll a und Chlorophyll b sowie verschiedene Karotinoide. In Kultur erreicht *C. vulgaris* auch unter mixotrophen oder heterotrophen Bedingungen hohe Biomassenproduktivitäten (Chen et al., 2011; Liang et al., 2009). Doucha & Lívanský (2006) beobachteten bei photoautotropher Kultivierung von *Chlorella sp.* in open-ponds eine Biomassenproduktivität von $32,2 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$. Sowohl ihre Robustheit, die hohe Wachstumsrate und der Lipidgehalt machen *C. vulgaris* geeignet für die Abwasserreinigung. Sie wurde erfolgreich im kommunalen Kläranlagen (De-Bashan et al., 2004), ebenso wie in Abwässern aus Brauereien (Raposo et al., 2010) oder der Textilindustrie (Lim et al., 2010), sowie in Papierfabrikabwasser, welches den Fokus dieser Arbeit bildet, eingesetzt. Bei der Papierproduktion entstehen jährlich rund 230.000.000 m³ Abwasser nach Angaben des „VERBAND DEUTSCHER PAPIERFABRIKEN E.V.“ (Jung et al., 2014). Folglich ist es auch in dieser Industrie von Vorteil, die Aufbereitung vom Abwasser energetisch effizient zu gestalten und Ressourcen effektiver zu nutzen. Für einen effektiven Reinigungsprozess in biologischen Kläranlagen sind optimale Lebensbedingungen für die Mikroorganismen (Sauerstoffversorgung, pH-Wert, Temperatur, Nährstoffe) erforderlich. Es wird zwischen Abwasserteichanlagen, Festbettreaktoren und Belebungsanlagen unterschieden. Traditionell findet die biologische Reinigung von Papierfabrikabwasser in Belebungsbecken statt, da diese sich den variierenden Abwasserzusammensetzungen sehr gut anpassen. Der

Belebtschlamm setzt sich aus verschiedenen aeroben Bakterien sowie Protozoen und Pilzen zusammen. Diese sorgen für die Degradierung von verschiedensten im Abwasser enthaltenen Substanzen und müssen dafür aber mit ausreichend Sauerstoff versorgt werden. Zur Reduzierung dieser überproportional hoher Belüftungskosten können Mikroalgen eingesetzt werden (Oswald, 1995).

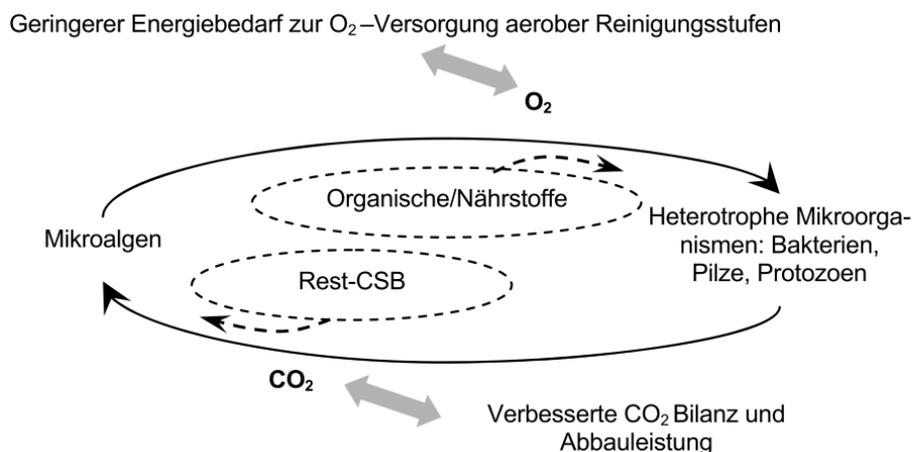


Abb. 1: Wechselwirkung zwischen Mikroalgen und heterotrophen Mikroorganismen im Abwasser (nach Weinberger et al. (2012)).

Aufgrund des schnellen Wachstums und hoher Reproduktion gelten Mikroalgen als vielversprechende Biomassenproduzenten. Für derartige Ziele werden Mikroalgen entweder in geschlossenen Systemen, wie Photobioreaktoren (PBR) oder in offenen Kultivierungssystemen, wie zum Beispiel Open-Ponds, kontrolliert kultiviert. Insbesondere in offenen Systemen besteht eine erhöhte Kontaminationsgefahr durch andere Mikroalgen, Bakterien, Pilze und Viren (Mata et al., 2010). Bei vielen Einsatzgebieten, wie bei der pharmazeutischen oder kosmetischen Anwendung ebenso wie im Bereich der Lebensmittel, ist eine Kontamination unerwünscht, da dies eine Beeinträchtigung des angestrebten Endproduktes zu Folge haben könnte und nicht den Richtlinien entspricht (Lorenz & Cysewski, 2000). In anderen Bereichen, wie der Biomassenproduktion zur energetischen Nutzung (Chisti, 2007), kann es gerade vom Vorteil sein, wenn durch das koordinierte Zusammenwirken zwischen Mikroalgen und Bakterien eine erhöhte Biomassen- und Lipidproduktivität erreicht wird (Gonzalez & Bashan, 2000; Stockenreiter et al., 2012). Gerade das Zusammenwirken zwischen verschiedenen Mikroorganismen ist in der Natur eher die Regel als die Ausnahme. Die Koexistenz von Bakterienarten in einer Phytoplankton-Gemeinschaft kann äußerst vielseitig sein und mit Änderungen der Umweltbedingungen stark variieren. Green et al. (2004) wiesen 61 Bakterienarten vergesellschaftet mit dem Dinoflagellat *Gymnodinium catenatum* nach. Watanabe et al. (2005) isolierten fünf Begleitorganismen der Grünalge *C. sorokiniana*. In einem mit *C. vulgaris* und *Acutotestmus*

obliquus betriebenen PBR wurden etwa 30 Bakterienarten identifiziert (Krohn-Molt et al., 2013). Die Interaktion zwischen Mikroalgen und Bakterien wird in „lockere“ und „enge“ Assoziationen gegliedert, die als stimulierend oder hemmend für einen oder beide Teilnehmer charakterisiert werden (Cole, 1982). Dabei können diese Interaktionsformen von mutualistisch über kommensalistisch bis hin zu symbiontisch reichen. Für technische Anwendungen ist ein möglichst koordiniertes Zusammenwirken der beiden Partner angestrebt. Hierbei stellen Biozöosen Lebensgemeinschaften aus verschiedenen Organismen in einem abgrenzbaren Lebensraum, die in Wechselbeziehung stehen, dar.

Untersuchungen von Chrost (1983) zeigten einen beidseitigen Nutzen (Mutualismus) in einer Gemeinschaft zwischen Mikroalgen und heterotrophen Bakterien. Ergebnisse weisen die Aufnahme des extrazellulären organischen Kohlenstoffs durch die Bakterien auf, der von den Mikroalgen freigesetzt worden ist. Im Gegensatz dazu beeinflussen die Bakterien das Wachstum der Algen positiv. Watanabe et al. (2005) beschreiben ebenfalls einen gegenseitigen als auch einseitigen Nutzen (Kommensalismus) zwischen *Chlorella* und 5 isolierten und identifizierten Begleitorganismen. Gonzalez & Bashan (2000) untersuchten einen wachstumssteigernden Effekt der Algen *C. vulgaris* bei Co-Immobilisierungsversuchen mit *Azospirillum brasilense*. Guo & Tong (2014) isolierten drei prokaryotische Begleitorganismen aus einer *C. vulgaris* Kultur. Diese Bakterienisolate wurden *Pseudomonas alcaligenes*, *Elizabethkingia miricola* und *Methylobacterium radiotoleran* zugeordnet. Entsprechende Co-Kultivierung der Alge mit den einzelnen Bakterienisolaten ergaben interessante Resultate. Lediglich bei der Co-Kultivierung mit dem Vertreter der Gattung *Pseudomonas* wurde eine wachstumsfördernde Wirkung auf *C. vulgaris* nachgewiesen. Entsprechende Experimente mit den Gattungen *Elizabethkingia* und *Methylobacterium* resultierten in einem gegenteiligen Effekt.

Um mikrobielle Biozöosen zu charakterisieren, bestehen verschiedene Möglichkeiten. Man unterscheidet kultivierungsabhängige und kultivierungsunabhängige Verfahren. Die Beschreibung der Populationsstruktur verschiedener Lebensräume erfolgte viele Jahre lang auf der Basis kultivierungsabhängiger Verfahren. Dafür ist es in der Regel erforderlich, die entsprechenden Organismen zu isolieren und als Reinkultur untersuchen zu können. Über phänotypische Charakteristika der entsprechenden Reinkulturen ist es dann möglich, Rückschlüsse auf Zusammenhänge zwischen den Populationen und den Biotopeigenschaften zu ziehen. Der bedeutende Vorteil der kultivierungsabhängigen Populationsanalyse liegt im Vorhandensein der Reinkulturen. Zum einen sind diese nach Belieben vermehrungsfähig und zum anderen sind physiologische, bzw. metabolische Untersuchungen möglich. Nachteilig ist, dass bereits die Wahl der Anreicherungsbedingungen (z.B. Komplex- oder Selektivmedium) das Ergebnis beeinflussen. Das Wachstum bestimmter Stoffwechselformen wird begünstigt durch die

Parameter wie Inkubationstemperatur, Atmosphärendruck oder Gaszusammensetzung. Weiterhin sind die Isolierungsansätze abhängig von der Kultivierbarkeit der einzelnen Arten. So befinden sich einige Bakterienarten in einem *viable but non-culturable* Stadium (Colwell et al., 1985), d.h. sie sind metabolisch aktiv jedoch nicht kultivierbar (Li et al., 2014). Derzeit vermutet man, dass nur ein geringer Teil der mikrobiellen Diversität durch kultivierte Vertreter repräsentiert wird (Amann et al., 1995).

Dagegen sind metagenomische Populationsanalysen unabhängig von der Kultivierbarkeit einzelner Organismen. Mittels molekularbiologischen Methoden wird die Gesamtheit des Genoms eines Biotops erfasst. Besonders gut eignen sich hierfür die Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) Methode (Muyzer et al., 1993). Hierfür wird die genomische DNA eines zu untersuchenden Habitats (z. B. Sedimente, Biogasreaktor, Boden u.v.m.) isoliert und mittels spezieller Primer in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ein Teilbereich (Amplikon) der 16S-rRNA-Gene vervielfältigt und anschließend werden die DNA-Fragmente in einem denaturierenden Polyacrylamidgel getrennt. Die DGGE eignet sich gut für einen Einblick in die mikrobielle Zusammensetzung in einem Habitat, jedoch stößt sie bei quantitativen Auswertungen von Häufigkeiten zwischen einzelnen phylogenetischen Gruppen an ihre Grenzen. Für diesen Zweck eignet sich die Hochdurchsatz-Sequenzierungstechnologie besser. In den vergangenen Jahren wurden rasante Fortschritte in der DNA-Sequenzierungstechnologie erbracht. Das *Next-Generation-Sequencing* (NGS) erstellt Sequenzrohdaten im Gigabasenbereich in wenigen Tagen (MacLean et al., 2009). Dies ermöglicht eine Vielzahl von Mikroorganismen, ohne vorherige Kultivierung zu identifizieren und Einblicke in ihre Funktion zu erhalten, wodurch sich das Wissen über das Vorkommen und die ökologische Bedeutung von Mikroorganismen erheblich erweitert (Steele & Streit, 2005).

In den letzten Jahren wurden informative und detaillierte Sequenzdatensätze unterschiedlicher Habitate wie Boden (De Gannes et al., 2015), Biogasanlagen (Röske et al., 2014; Sahm et al., 2013), menschlicher Darm (Qin et al., 2010), Belebtschlamm (Ju et al., 2014), Photobioreaktor (Krohn-Molt et al., 2013) und thermophiler Umgebungen (Lewin et al., 2013) u.v.m. veröffentlicht. Analysen dieser Größenordnung beleuchten eine komplexe mikrobielle Vielfalt und reichlich funktionelle Gene.

Die mikrobielle Biozönose setzt sich in einer mit Mikroalgen und Belebtschlamm (Bakterieninokula) betriebenen Reinigungsanlage aus unterschiedlichen Mikroorganismen zusammen. Bereits der Belebtschlamm beinhaltet eine hochkomplexe mikrobielle Lebensgemeinschaft, die auf Umweltbedingungen und die Abwasserinhaltsstoffe reagiert. Ju et al. (2014) beschrieben die saisonale mikrobielle Dynamik im Belebtschlamm einer kommunalen Kläranlage. Nur wenige Studienergebnisse existieren zur Populationsdynamik von Abwasserreinigungsanlagen, die mit Mikroalgen und Bakterien betrieben werden (Su et

al., 2011). Bislang durchgeführte Populationsanalysen wurden in Bezug auf die räumliche Situation durchgeführt, und wenige Informationen existieren im Moment über die zeitliche Entwicklung in einem Lebensraum. Folglich sind metagenomische Untersuchungen zur mikrobiellen Produktionsdynamik über einen längeren Zeitraum erforderlich. Detaillierte Kenntnisse über die Wechselwirkungen zwischen Standortbedingungen und jeweils dominierenden Populationen sind Voraussetzungen zur weiteren Optimierung dieser Technologie.

Die Wechselwirkung zwischen autotrophen Mikroalgen und heterotrophen Bakterien beschränkt sich nicht nur auf den CO₂ / O₂-Austausch. Mikroalgen profitieren von der Sekretion von Vitaminen und anderen wachstumsfördernden Substanzen durch die Bakterien, da die meisten Mikroalgen auxotroph für verschiedene Vitamine sind (Mouget et al., 1995). Croft et al. (2006) stellten Analysedaten von 306 Algenarten und ihren Vitaminverhalten zusammen. Mehr als die Hälfte dieser Algen benötigte Vitamin B₁₂ (Cobalamin), 22% Vitamin B₁ (Thiamin) und ein kleinerer Anteil (5%) Vitamin B₇ (Biotin). Prokaryotische Mikroorganismen sind nicht nur für die Umsetzung von gelöstem organischem Kohlenstoff verantwortlich, sondern durch ihre Stoffwechsellleistungen in zahlreichen Stoffflüssen wie Nitrifizierung, Denitrifizierung und Sulfatreduktion eingebunden. Einerseits können Mikroalgen antibakterielle Substanzen ausscheiden wie Chlorellin (Pratt et al., 1944) um das Bakterienwachstum zu reduzieren, andererseits durch die Bereitstellung von organischen Stoffen das Bakterienwachstum unterstützen (Guo & Tong, 2014).

So bringt der Einsatz von Mikroalgen in der Abwasserreinigung nicht nur den Sauerstoff für das Bakterienwachstum, sondern weitere Vorteile mit sich. Sie entfernen überwiegend die Abwasserinhaltsstoffe Stickstoff und Phosphat, die sie u.a. für die Protein- und Phospholipidsynthese benötigen. Des Weiteren sind Mikroalgen in der Lage, eine Vielzahl an Schwermetallen, wie Kupfer, Nickel, Cadmium und Quecksilber zu akkumulieren (Mehta & Gaur, 2005; Mehta & Gaur, 2001; Rai & Mallick, 1992; Robinson & Wilkinson, 1994; Sandau et al., 1996) und somit dem Abwasser zu entziehen. Zudem wurde ein Rückgang von Pathogenen im Abwasser beobachtet. Da für den Calvinzyklus Kohlendioxid verbraucht wird, steigt der pH-Wert aufgrund der Veränderung des Kohlendioxid-Gleichgewichts im Wasser (Schumacher et al., 2003). Außerdem kann die überschüssige Biomasse zur Biogasproduktion verwendet werden (Wieczorek et al., 2015). All diese Erkenntnisse führten in den vergangenen Jahren zu Untersuchungen der Reinigung von industriellen, kommunalen und landwirtschaftlichen Abwässern mit Mikroalgen und Bakterien (Gutzeit et al., 2005; Oswald et al., 1957; Van den Hende et al., 2014a; Weinberger et al., 2015; Weinberger et al., 2012).

Forschungsarbeiten sind zu mikroalgenbasierter Abwasserbehandlung in Bezug auf verschiedene Mikroalgenpezies (Su et al., 2012a), Mischgeschwindigkeiten (Su et al., 2012b), hydraulische Retentionszeit (Medina & Neis, 2007), Erntetechnologien, anaerobe Vergärung von Mikroalgen-Bakterien-Biomasse (Park et al., 2013; Passos et al., 2014; Wieczorek et al., 2015) und unterschiedliche Abwassertypen (Van den Hende et al., 2014b) bearbeitet worden. Allerdings gibt es nur wenig Information über die symbioseartige Wechselbeziehung zwischen Mikroalgen und Bakterien in einem derart komplexen System. Entscheidend bei diesem Prozess ist das Zahlenverhältnis von Mikroalgen und Bakterien innerhalb der Flocken. Nach Gutzeit et al. (2005) ergibt sich aus der Nettphotosyntheserate und der Sauerstoffverbrauchsrate in der Theorie ein optimales Algen-Bakterien (ALBA) Verhältnis von 2:1. Su et al. (2012c) testeten unterschiedliche Inokulationsverhältnisse von Mikroalgen zu Bakterien. Hierbei gab es keine signifikanten Unterschiede in der Entfernungseffizienz der organischen Stoffe (CSB) im Abwasser. Jedoch wurde eine verbesserte Absetzbarkeit der akkumulierten Biomasse beobachtet und höhere Stickstoff- und Phosphorumsatzraten. Guieysse et al. (2002) beschreiben einen Einfluss auf den Salicylatabbau in einem geschlossenen Kultivierungssystem bei unterschiedlichen Inokulationsverhältnissen von *Chlorella sorokiniana* zu *Ralstonia basilensis*.

Der Frage, inwieweit sich das Zahlenverhältnis Algen zu Bakterien im Laufe der Untersuchungen ändert, wurde nur vereinzelt erforscht. Bereits zu Beginn dieser Arbeit wurde diese Problematik einer aufwändigen mikroskopischen Zählung erkannt. Zum einen erreichte die Zählung ihre Grenzen vor allen im bakteriellen Größenbereich, und zum anderen war eine mikroskopische Zählung aufgrund der kompakten Flockenstruktur nur bedingt möglich. Unter einer kompakten Flockenstruktur ist die Bildung von Flocken, in denen Bakterien aus dem Belebtschlamm und Mikroalgen inkorporieren, zu verstehen.

Zwei Methoden zur Quantifizierung des individuellen Zahlenverhältnisses zwischen Algen und Bakterien aus einer Mischkultur sind bekannt. Shriwastav et al. (2015) bestimmte die Einzelkonzentration von Algen- und Bakterien-Biomasse mittels manueller Zählung. Zunächst wird der Umrechnungsfaktor ermittelt, der die Umwandlung der Algenanzahl in die Algenkonzentration ermöglicht. Die Bakterienkonzentration wird durch die Subtraktion der Algenkonzentration aus der gravimetrisch bestimmten Gesamtkonzentration berechnet.

Nach der Methode von Cromar & Fallowfield (1992) wird der Anteil der Algen- und Bakterienbiomasse gravimetrisch in einem zweistufigen Verfahren bestimmt. Die Proben werden zunächst mechanisch durch Schütteln und chemisch mit einem Borsäure/Natriumcholat/PEG/Formaldehyd/Glutaraldehyd-Gemisch vorbehandelt und anschließend über einen Dichtegradienten zentrifugiert. Anschließend werden die Fraktionen einzeln mit einer Pipette entfernt und gravimetrisch bestimmt.

Das Zahlenverhältnis Algen zu Bakterien ist ein wichtiger Kontrollparameter für die Prozessführung in der Abwasserbehandlung. Eine exakte Quantifizierung des Verhältnisses sollte eine effizientere Prozessführung ermöglichen und außerdem dabei helfen, die Dynamik und das Zusammenleben von Bakterien und Algen in den Flocken genauer zu erforschen. Bislang fehlte es an einer praktikablen und zuverlässigen Quantifizierungsmethode.

Wegen des bereits erwähnten hohen Belüftungsaufwands und des damit hohen Energieeintrags in biologischen Reinigungsprozessen gewinnt die Sauerstoffleistung der Mikroalgen in ALBA-betriebenen Anlagen zunehmend an Bedeutung. Je schneller und je mehr Stoffe abgebaut werden desto mehr Sauerstoff wird benötigt. Bei der Kombination von Mikroalgen und Bakterien spielt die Wechselwirkung beider Komponenten eine entscheidende Rolle und unterliegt zugleich einer dynamischen Abhängigkeit. Der photosynthetisch produzierte Sauerstoff, der im Medium frei verfügbar ist, wurde als ein limitierender Faktor in mikroalgenbasierten Systemen ermittelt (Guieysse et al., 2002; Munoz & Guieysse, 2006). Die klassische Beschreibung der Photosyntheseleistung beruht auf den Elektroden-Messungen der Sauerstoffentwicklung im Verhältnis zur Lichtintensität, der sogenannten Photosynthese-Lichtkurve (Photosynthesis-Irradiance, PI-Kurve). Eine modernere Methode ist die Erstellung der Rapid Light Curve (RLC) mittels Dual Pam. Beide Methoden liefern detaillierte Informationen über die photosynthetische Leistung wie maximale Sauerstoffproduktionsrate/ Elektronentransportrate (P_{max}/ETR_{max} , Photosynthesekapazität), Steigung (α , Photosyntheseeffizienz) und Lichtsättigungspunkt (I_K) einer Probe. Der Verlauf der PI-Kurven ist durch eine typische Sättigungskurve charakterisiert. Die Berechnung der Photosyntheseparameter P_{max} , α und I_K aus der erstellten PI-Kurve ist mittels spezieller Modelle möglich. Man unterscheidet zwischen empirischen Modellen mit und ohne photoinhibitorischen Einflussfaktor und dynamischen Modellen (Gilbert et al., 2000). Die Photosyntheseleistung der Mikroalgen ist von unterschiedlichen Parametern abhängig. Zum einen ist sie in einer Outdoor-Anlage durch das eintreffende Licht auf die Algen im Verlauf eines Tages in der Tageslänge und Bewölkung variabel. Zum anderen ist eine geringere Absorption durch die Algenzellen, durch die Anlagerung und der damit verbundenen Lichtstreuung durch biofilmbildende Mikroorganismen an Reaktoroberflächen möglich. Zudem führt eine zu hohe Algenkonzentration zur gegenseitigen Beschattung und damit auch zu einer Verringerung der photosynthetischen Aktivität der Zelle (Su et al., 2012c). Weiterhin ist die Lichtverteilung durch die Flockenmorphologie beeinflusst.

Somit ist der Sauerstoffeintrag durch die Mikroalgen in ALBA-betriebenen Anlagen für das Wachstum, die Instandhaltung und für andere Stoffwechselwege der Bakterien essentiell.

Um eine bestmögliche photosynthetische Aktivität der Mikroalgen für das jeweilige System zu erreichen, ist eine optimale Populationsdichte zu gewährleisten. Die Produktivität aller Mikroalgenkulturen hängt hauptsächlich von der Biomassekonzentration ab. So nahm die Sauerstoffproduktionsrate von *Ettlia* sp. bei einer Zellkonzentration von mehr als 4 g L⁻¹ ab (Sarrafzadeh et al., 2015).

Das Zusammenleben zwischen Algen und Bakterien führt zu zahlreichen Möglichkeiten an Algen-Algen-, Bakterien-Algen- und Bakterien-Bakterien-Wechselwirkungen, so dass es zunächst unmöglich erscheint, diese komplexen Beziehungen zu studieren geschweige denn zu kontrollieren. Daher soll diese Doktorarbeit einen Beitrag leisten, die Interaktion von Mikroalgen und Bakterien in der Abwasserreinigung durch physiologische, mikrobiologische und molekularbiologische Untersuchungen besser zu verstehen und zu optimieren.

Geplant sind unter anderem Untersuchungen zur Reinigung von Papierfabrikabwasser mittels Mikrolagen-Bakterien-Flocken, zunächst im Labormaßstab durchzuführen, und die hieraus abgeleiteten Erkenntnisse auf die Pilotanlage zu übertragen. Insbesondere die Ausbildung einer stabilen Biozönose soll im Fokus der Untersuchungen dieser Arbeit stehen. Hierzu soll die Zusammensetzung der EPS-Komponenten der ALBA-Flocken untersucht werden, um auf die Stabilität der ALBA-Flocken rückzuschließen. Zum anderen soll die Bestimmung des Chlorophyllgehaltes in der ALBA-Biomasse und im Nachklärbecken die Vergesellschaftung der Mikroalgen mit den Bakterien in den Flocken ermittelt werden.

Weiterhin ist eine Voraussetzung für eine optimale Prozesssteuerung, die detaillierte Kenntnis der Wechselwirkungen zwischen Standortbedingungen und jeweils dominierenden Populationen. So soll molekularbiologisch die mikrobielle Gemeinschaft mittels DGGE-Analyse und Illumina/MiSeq-Sequenzierung näher betrachtet werden.

Erster Schritt ist die zuverlässige Quantifizierung von Mikroalgen- und Bakterienmasse, um Aussagen über die Dynamik in so einem Lebensraum machen zu können.

Die Bestimmung über die optimale Einsatzkonzentration der Mikrolagen *C. vulgaris* für eine hohe Sauerstoffproduktion in der Abwasserreinigung und damit die Minimierung einer gegenseitigen Verschattung würde zu einem stabilen Zustand für die Mikroalgen und des ALBA-Systems führen.

3. Material und Methoden

Für diese Arbeit wurden unterschiedliche Chemikalien, Mikroalgenpezies, Testsysteme und Analyseverfahren verwendet, die im folgenden Abschnitten beschrieben werden.

3.1 Mikroalgen und Belebtschlamm

Die Mikroalge *Chlorella vulgaris minima* (MZCH Nr.: 10162) wurde von M. Engels aus einem Abwasserpond in Hamburg isoliert und wurde für die Untersuchungen verwendet.

Als Bakterien Inokulum, wurde Belebtschlamm aus der Abwasserreinigungsanlage (ARA) einer Papierfabrik (Feinpappenwerk Gebr. Schuster GmbH & Co. KG, Hebertshausen, Deutschland) sowie aus dem Klärwerk Dradenau (Hamburg Wasser, Hamburg) bezogen und umgehend verwendet.

3.2 Chemikalien

Die Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (München), Roth (Karlsruhe) und Serva Feinbiochemica (Heidelberg), mit dem Reinheitsgrad „zur Analyse“, bezogen.

3.3 Mikrobiologische Methoden

Alle Kulturmedien, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden vor der Verwendung bei einer konstanten Temperatur von 121 °C 20 min autoklaviert. Hitzeempfindliche Zusätze wurden steril filtriert und nach Abkühlung des Mediums zugegeben. Nachfolgend werden die Medien beschrieben.

3.3.1 Kultivierung der Mikroalge *Chlorella vulgaris minima*

Das Kessler & Czygan (1970) Medium (KC) wurde zur Kultivierung der Mikroalge *Chlorella vulgaris minima* im Multikultivator MC 1000-OD (PSI, Tschechien) sowie im laborinternen 2 L Kultivierungsreaktor (Schott) verwendet. In Tab. 1 wird die Zusammensetzung des KC-Mediums aufgeführt.

Tab. 1: Nährstoffzusammensetzung des KC-Mediums.

Nährstoffe	Stammlösung 1000-fach	Konzentration im Medium
KNO ₃	81 g	810 mg (10 mL)
NaCl	47 g	470 mg (10 mL)
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	47 g	470 mg (10 mL)
NaH ₂ PO ₄	36 g	360 mg (10 mL)

MgSO ₄ x 7H ₂ O	25 g	250 mg (10 mL)
Stammlösung 100-fach		
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x H ₂ O	20 mg	0,20 mg (1 mL)
CaCl ₂ x 2H ₂ O	1500 mg	15 mg (1 mL)
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	20 mg	0,20 mg (1 mL)
H ₃ BO ₃	50 mg	0,50 mg (1 mL)
MnCl ₂ x 4H ₂ O	50 mg	0,5 mg (1 mL)
FeSO ₄ x 7H ₂ O	600 mg	6 mg (1 mL)
EDTAIII (TitrplexIII)	800 mg	8 mg (1 mL)
H ₂ O _{bidest.}		ad 943 mL

Als Starterkultur wurde die Alge *Chlorella vulgaris minima* in einem 10 L Kultivierungsreaktor angezogen. Die Kultur wurde kontinuierlich in einer 20 °C Klimakammer mit einem Tag-Nacht Zyklus von 14:10 Stunden gerührt. Eine Lichtintensität von 200 µmol Photonen m⁻²s⁻¹ wurde durch Tageslichtröhren bewerkstelligt. Die Kultur wurde durch Luft mit 4 % CO₂ durch einen Schlauch mit einem Sterilfilter begast. Die Kultivierung im Multikultivator erfolgte bei gleichen abiotischen Einstellungen.

3.3.2 Abwassermedien

Für die Laboruntersuchungen wurde ein synthetisches Abwasser in Anlehnung an die DIN 38412 Teil 24 oder ein reales Abwasser aus dem Ablauf der Hochlaststufe Abwasserreinigungsanlage (ARA) einer Papierfabrik (Feinpappenwerk Gebr. Schuster GmbH & Co. KG, Hebertshausen, Germany) als Medium eingesetzt.

Tab. 2: Nährstoffzusammensetzung des synthetischen Abwassers nach DIN 38412 Teil 24.

Nährstoffe	Stammlösung 100-fach	Einsatz in 1 L Ansatz
Pepton	2,2 g	10 mL
Hefeextrakt	1,5 g	10 mL
Harnstoff	0,4 g	10 mL
(NH ₄)HCO ₃	0,3 g	10 mL
NaCl	0,2 g	10 mL
KH ₂ PO ₄	0,2 g	10 mL
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	0,2 g	10 mL
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,05 g	10 mL
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,05 g	10 mL
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4H ₂ O	0,02 g	1 mL
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,02 g	1 mL

H ₃ BO ₃	0,05 g	1 mL
MnCl ₂ x 4H ₂ O	0,05 g	1 mL
FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,06 g	1 mL
EDTA III (TitriplexIII)	0,08 g	1 mL
H ₂ O _{bidest.}		ad 904 mL

Das Abwasser aus der Papierfabrik hatte folgende Konzentrationen an CSB: 464,10±194,70 mg O₂ L⁻¹, NH₄-N: 2,12±2,20 mg L⁻¹, NO₃-N: 3,067±1,60 mg L⁻¹, NO₂-N: 0,08±0,02 mg L⁻¹, und PO₄-P: 8,47±6,30 mg L⁻¹ (Auswertung aus 10 Proben).

3.3.3 Herstellung von R2A-Agarplatten

Zur Kultivierung heterotropher Bakterien aus Wasserproben auf Agarplatten wurden 18,1 g R2A-Agar gelöst in einem Liter H₂O_{dest.} verwendet. Das noch flüssige Medium wurde nach dem Autoklavieren in sterile Petrischalen gegossen. Die Lagerung erfolgte bis zur Verwendung bei 4 °C.

3.3.4 Bestimmung der Lebenszellzahl

Die Lebendzellzahl wird durch Auszählen der Kolonien ermittelt. Zunächst wird eine Verdünnungsreihe erstellt.

Dazu werden 6 Reagenzgläser mit 900 µL 0,9 % NaCl befüllt. In das erste Gefäß kommen 100 µL der Ausgangsprobe. Nach einer Durchmischung werden 100 µL in das zweite Gefäß überführt usw. Von jeder Verdünnungsstufe werden 100 µL auf R2A-Agarplatten ausgespatelt. Nach 24h Inkubation bei 35±2 °C werden die entstandenen Kolonien gezählt. Zur Bestimmung der Koloniebildenden Einheit (KBE) wird folgende Formel verwendet:

$$\text{Zellen pro mL} = \frac{x_{\text{gezählte Kolonien}} * 10_{\text{Verdünnungsfaktor}}}{0,1_{\text{Impfvolumen}}}$$

3.4 Kultivierungstestsysteme

3.4.1 Kultivierung von Algen-Bakterien-Flocken im Labor

Im Labor wurde die Reinigungskapazität von Algen-Bakterien (ALBA)-Biozönosen im kontinuierlichen Betrieb untersucht. Für die Herstellung der Algen-Bakterien-Flocken im Abwasser wurde die Reinkultur von *C. vulgaris* (3.3.1) und der Belebtschlamm als Bakterien-Inokulum (3.1) verwendet. Für die Ansetzung der 2 L Reaktoren (Rührreaktor-Set GLS 80, Roth, Deutschland) wurde zunächst die Trockensubstanz der Kulturen (3.10.7) bestimmt. Damit wurde das gewünschte Verhältnis Algen zu Bakterien eingestellt, indem die

berechnete Menge an Algen und Bakterien 10 min bei 3500 rpm zur Ankonzentrierung zentrifugiert wurde. Zum Schluss wurde der Reaktor mit synthetischem Abwasser / realem Abwasser (3.3.2) aufgefüllt. Die Algen-Bakterien-Kultur wurde in einem 20 °C Klimaraum und einem Tag-Nacht Rhythmus von 14:10 Stunden und einer Lichtintensität von 200 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ bei 100 rpm unter Rühren kultiviert. Während der Kultivierung wurden physikalisch und chemische Analysen (3.10) durchgeführt, sowie die Überwachung des Sauerstoffgehaltes des Mediums (3.7.1). Mikroskopische Beobachtungen wurden mit einem Mikroskop (Axio Imager A1, Zeiss, Deutschland) durchgeführt. Der Bioreaktor wurde als Fed-Batch-Verfahren betrieben. Sobald der CSB Wert unter 100 mg L^{-1} lag wurde erneut Abwasser hinzugegeben.

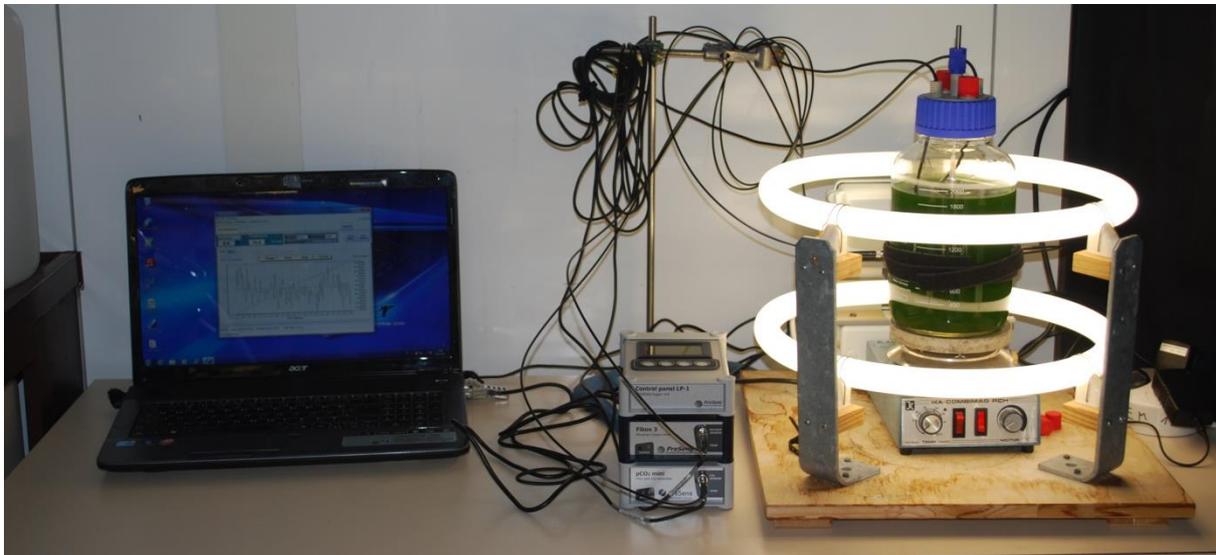


Abb. 2: Versuchsaufbau der Abwasserreinigung mittels Algen-Bakterien-Flocken im 2 L Reaktor mit nicht invasiver O_2 -Überwachung (PreSens).

3.4.2 Kultivierung von Algen-Bakterien-Flocken im Outdoorsystem

Für eine kontinuierliche Abwasserreinigung mittels ALBA-Flocken wurde eine Pilotanlage in München (Herbertshausen) mit einem Fassungsvermögen von 724 L (Reaktor 800 mit einer Bauhöhe von 0,5 m) bzw. 1608 L (Reaktor 1600 mit einer Bauhöhe von 1 m) aufgebaut. Beide Bioreaktoren weisen zylindrische Behälter mit einer schrägen Krempe und einem Rührgerät auf. Die Vorkultivierung von *C. vulgaris* wurde in 3 offenen rechteckigen gerührten und mit CO_2 belüfteten Becken durchgeführt. Sobald ausreichend Algenbiomasse kultiviert worden war, wurden Algen und Belebtschlamm in einem TS-Verhältnis 2:1 (Algen:Bakterien) in die Reaktoren gegeben. Zulaufendes Abwasser wurde in einer 2-stufigen Voredimentation zunächst von Feststoffen befreit, bevor sie in die Bioreaktoren eingeleitet wurden. Aufgrund von niedrigen Stickstoff- und Phosphatzulaufrwerten des Abwassers wurde eine Nährstoffdosierung von einem C:N:P-Verhältnis 100:5:1 eingestellt und in die

Pilotreaktoren eingeleitet. In den Bioreaktoren nachgeschalteten Sedimentationsbecken erfolgt die Trennung des ALBA-Wasser-Gemisches. Überschuss-ALBA-Biomasse wurde manuell aus dem System entfernt. Ein Überblick der Anlage ist in Abb. 3 dargestellt.



Abb. 3: Versuchsaufbau der Pilotanlage zur Reinigung von Papierfabrikabwasser mittels Mikroalgen-Bakterien-Flocken. Aufnahmen zeigen 3 offene rechteckige Kultivierungsbecken und den 800 L Reaktor.



Abb. 4: Aufnahme des Kultivierungsbeckens (a) und des 800 L Reaktors (b) von oben.

Für weitere Details siehe Weinberger et al. (2015). Analog dem Labormaßstab, wurden physikalisch und chemische Analysen (3.10) durchgeführt. Zusätzlich wurde über den Betriebszeitraum dieser Reaktoren die Diversitätsanalyse der Bakterien- und Eukaryotengemeinschaft mittels DGGE untersucht.

3.5 Molekularbiologische Methoden

Für die molekularbiologischen Arbeiten wurden die hitzestabile Geräte und Lösungen bei einer Temperatur von 121 °C 20 min autoklaviert, um potentielle Kontaminationen der Proben zu vermeiden. Nicht-hitzestabile Geräte wurden mit 70 %-igem Ethanol gespült und temperaturempfindliche Lösungen steril filtriert.

3.5.1 Isolierung von DNA

Die genomische DNA wurde mit dem PowerSoil® DNA Isolation Kit (MOBIO Laboratories Inc, Carlsbad, CA, USA) nach den Anweisungen des Herstellers isoliert. Die verwendeten Proben stammen direkt aus dem Freilandreaktor der Abwasserreinigung mittels Algen-Bakterien-Flocken aus München. Die Proben wurden wöchentlich (dienstags) entnommen, eingefroren und anschließend für die DNA- und EPS Isolierung verwendet. Zunächst wurden 8 mL der Proben bei 4000 rpm 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet nach Herstellerangaben eingesetzt. Die DNA Reinheit und Konzentration wurde spektralphotometrisch gemessen (Pico100, Picodrop, Hinxton, Großbritannien).

3.5.2 Bestimmung der DNA-Konzentration und -Reinheit

Da nur ausreichend reine und konzentrierte DNA für die PCR weiterverwendet wurde, wurde die DNA Reinheit und Konzentration spektralphotometrisch gemessen (Pico 100, Picodrop, Hinxton, Großbritannien). Mit Hilfe der Absorptionsverhältnisse der Wellenlängen 260 nm zu 280 nm bzw. 260 nm zu 230 nm können Aussagen über die Reinheit einer Nukleinsäure-Probe getroffen werden. Für eine reine DNA-Probe gelten folgende Werte: $A_{260}/A_{280} = 1,8 - 2,0$; $A_{260}/A_{230} \geq 2,0$. Kleinere Werte weisen auf eine Kontamination mit Proteinen, Phenol oder ähnlichen Substanzen hin. Die DNA-Konzentration wird bei einer Absorption von 260 nm photometrisch bestimmt. Es gelten folgende Multiplikationsfaktoren (F): dsDNA $\triangleq 50 \mu\text{g mL}^{-1}$, RNA $\triangleq 40 \mu\text{g mL}^{-1}$, ssDNA $\triangleq 33 \mu\text{g mL}^{-1}$. V steht für den Verdünnungsfaktor. Die Konzentration (c) der jeweiligen Nukleinsäure bestimmt man durch folgende Formel:

$$c [\mu\text{g mL}^{-1}] = OD_{260} \times V \times F$$

3.5.3 Agarosegelelektrophorese

Die Größenbestimmung von Nucleinsäurefragmenten erfolgte gelelektrophoretisch mit Agarosegelen in einer mit 1x TAE-Puffer gefüllten Gelkammer (Wide Mini-Sub Cell GT Cell, Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, California). Fragmente der DNA-Isolierung (Größe ca. 40 kb) und PCR-Produkte (bis zu 2500 bp) wurden auf einem 0,8 % Agarosegel (w/v)

aufgetragen. Bei der Herstellung der Gele wurden diese mit 1 x GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Hayward, USA) angefärbt. Zur Erhöhung der Probendichte wurden die DNA-Proben mit Ladepuffer gemischt, so dass die Probe in die Geltasche sinkt. Als Größenstandard wurde je nach erwarteter Größe, der Marker GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Whatman, USA) aufgetragen. Die Fragmentgrößenüberprüfung der DNA -Isolierung erfolgt bei 120 V 30 Minuten, für die der PCR Produkte waren 25 Minuten bei 80 V ausreichend. Die elektrophoretisch getrennten DNA-Fragmente wurden mittels UV-Licht in der Gel-Dokumentationsanlage (DNR Bioimaging System, Jerusalem, Israel) visualisiert.

TAE (50x) nach Sambrook & Russell (2001)

Tris 2 M	242 g L ⁻¹
EDTA-Na ₂ x 2H ₂ O 0,1 M	37,2 g L ⁻¹
Eisessig 1 M	57,1 mL L ⁻¹

Der pH-Wert wurde auf 8,0 eingestellt.

DNA- Ladepuffer

Glycerol	50 %
EDTA	60 mM
Bromphenolblau	0,25 %

3.5.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifizierung von spezifischen Genombereichen *in vitro* erfolgt unter Verwendung spezifischer Primer und der DNA-Polymerase (Mullis & Faloona, 1987). Dabei werden drei aufeinanderfolgende Reaktionsschritte bei definierten Temperaturen zyklisch wiederholt. Der erste Schritt (Denaturierung) erfolgt bei 92 °C, dabei wird die doppelsträngige DNA in komplementäre Einzelstränge getrennt. Anschließend kommt es zum Annealing Schritt, der Anlagerung der Primer, die komplementär zu den flankierenden Sequenzen des zu amplifizierenden Genomabschnittes sind, an die separierten DNA-Stränge. Im dritten Schritt (Elongation) entfaltet die hitzestabile Polymerase ihre maximale Aktivität, und die Neusynthese in 5'- 3'- Richtung des Doppelstrangs beginnt an den Stellen, an denen die Primer gebunden sind.

Die PCR-Amplifikationen wurden in einem Thermocycler mit Heizdeckel (Primus 96 advanced® Gradient, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) durchgeführt. Das verwendete PCR-Programm richtete sich nach den unterschiedlichen Annealing-Temperaturen der Primer und der Länge des zu amplifizierenden Genabschnittes. Für die PCR-Ansätze wurde der OneTaq™ Master Mix (New England BioLabs GmbH, Frankfurt, Deutschland) verwendet. Dieser enthält Taq-Polymerase, dNTPs, Mg²⁺ und andere Puffer-Komponenten und Stabilisatoren. Der PCR Ansatz wurde auf Eis zusammenpipettiert, um einen frühzeitigen Start der Reaktion zu verhindern.

Die verwendeten Primer in dieser Arbeit wurden von der Firma Eurofins (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland) bezogen.

Tab. 3: Oligonukleotide zur Herstellung von 16S-rRNA und 18S-rRNA Amplikons.

Primer	Sequenz 5' → 3'	Referenz
GM5for*	- CCT ACG GGA GGC AGC AG -	Muyzer et al. (1993);
GM907rm	- CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT -	Muyzer et al. (1995)
1427–1453f*	- TCT GTG ATG CCC TTA GAT GTT CTG GG-	van Hannen et al. (1998)
1616–1637r	-GCG GTG TGT ACA AAG GGC AGG G -	
515F	-AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACT ATG GTA ATT GTG TGC CAG CMG CCG CGG TAA-	Caporaso et al. (2011)
806R	-CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT (Barcode) AGT CAG TCA GCC GGA CTA CHV GGG TWT CTA AT-	Klindworth et al. (2013)

*CGCCCCGCGCCCCGCGCCCCGTCCCGCCGCCCGCCCCGCCCCG, Vorwärtsprimer für die DGGE Analyse erhielten eine 40 bp- GC Klammer am 5'-Terminus. IUPAC Ambiguity: Code M steht für A oder C.

3.5.4.1 Aufreinigung von PCR-Produkten

Im Anschluss an die PCR wurden die Amplifikate mit dem Gel/ PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) aufgereinigt. Dabei ist das Kit so konzipiert, dass DNA-Fragmente in einer Glasfasermatrix gebunden und Verunreinigungen mit einem Waschpuffer entfernt werden. Auch Salze, Enzyme und nicht eingebauten Nucleotide werden wirksam aus dem Reaktionsgemisch entfernt. Alle verwendeten Lösungen und Säulen waren in dem Kit enthalten und wurden gemäß der Angaben des Herstellers verwendet. Die eluierte DNA wurde anschließend mit ein 0,8 %iges Agarosegel erneut mittels Gelelektrophorese überprüft.

3.6 Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE)

Bei der Denaturierenden Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) werden DNA-Fragmente gleicher Länge in einem denaturierenden Polyacrylamidgel mit einem Formamid/Harnstoff-Gradienten in Laufrichtung von oben nach unten getrennt (Muyzer et al., 1993). Somit werden Mischamplifikate aufgrund unterschiedlicher GC Gehalte aufgetrennt. Dabei sind DNA-Fragmente mit hohem GC Gehalt stabiler und wandern weiter im Gel, als die mit geringem GC Gehalt. Die Vorwärtsprimer besaßen eine GC-reiche Sequenz, die während des Schmelzprozesses einer kompletten Dissoziation der Einzelstränge entgegenwirkte. Es

resultiert ein charakteristisches Bandenmuster zur Aufklärung von Diversität, wobei im Idealfall eine Bande eine Spezies repräsentiert.

Für die DGGE wurde die genomische DNA aus entsprechendem Probenmaterial extrahiert. Zur Amplifizierung spezifischer Gensequenzen wurden verschiedene Primer-Kombinationen für verschiedene phylogenetische Linien verwendet. Für die bakterielle 16S rRNA-Gene wurde die Primer GM5f* und GM907rM (Muyzer et al., 1993; Muyzer et al., 1995) verwendet. Bei der bakteriellen PCR wurde zur Erhöhung der Spezifität der Amplifikation und die Reduzierung von Bildung störender Nebenprodukten, eine Touchdown (TD) PCR durchgeführt (Don et al., 1991; Korbie & Mattick, 2008). Bei einer TD- PCR wird die Annealing Temperatur bei jedem zweiten Zyklus um 1°C gesenkt bis zu einem Touchdown, bei dieser Temperatur werden zehn zusätzliche Zyklen durchgeführt. Die Eukaryoten Diversität wurden mit den Primern 1427f* und 1616r (van Hannen et al., 1998) abgedeckt. Für die bakteriellen Amplikons wurde eine Länge von 586 bp erwartet. Eukaryotische Amplikons lagen bei einer Länge von ca. 400 bp. Die PCR-Reaktionen erfolgten in 50 µL-Ansätzen und wurden auf Eis wie folgt pipettiert: 25 µL vom OneTaq® 2x Master Mix mit Standard Puffer (New England BioLabs GmbH, Frankfurt, Deutschland), 25 pmol Vorwärtsprimer, 25 pmol Rückwärtsprimer, 100 ng von der gesamt DNA und anschließend auf ein Endvolumen von 50 µl mit sterilem Wasser aufgefüllt. Die PCR Bedingungen sind in (Tab. 4) aufgeführt. Die Amplifikationsprodukte wurden auf einem 0,8 %-igem Agarosegel überprüft.

Tab. 4: Reaktionsbedingung zur Amplifikation der 16S-rRNA-Gene bei Bakterien (a), 18S-rRNA-Gene bei Eukaryoten (b) und der variablen V3- und V4-Region des 16S-rRNA-Gens für die MiSeq/Illumina Sequenzierung (c).

Reaktionsschritt	Temperatur/ Zeit	Anzahl der Zyklen
(a) Initiale Denaturation:	94°C 4 min	
Denaturation:	94°C 60 s	} 30
Annealing: 	65°C - 55°C 60 s (je Grad 2 Zyklen)	
	55°C 60 s (10 Zyklen)	
Elongation:	72°C 30 s	
Finale Elongation:	72 ° C 15 min	
(b) Initiale Denaturation:	94°C 5 min	
Denaturation:	94°C 30 s	} 25
Annealing:	52°C 60 s	
Elongation:	68°C 90 s	
Finale Elongation:	68°C 10 min	

folgt durchgeführt. 1 g APS in 10 mL sterilem Wasser lösen und zu 500 µl in Reaktionsgefäße aliquotieren. Die Lagerung fand bei -20°C statt. Das Gesamtvolumen des Trenngels betrug 30 mL. Zur Polymerisation wurden APS und TEMED hinzugegeben. Die Lösungen (Tab. 6) sind mit Hilfe eines Gradientenmischers zu einem linearem Formamid/Harnstoff-Gradienten gegossen worden. Die Aushärtung des Gels erfolgte über Nacht oder 6 h.

Tab. 6: Pipettierschema zur Herstellung des Acrylamidgels für die bakterielle Trennung.

	0% Denaturierung	20% Denaturierung	80% Denaturierung
	Lsg.	Lsg.	Lsg.
Denaturierungslösung	7 mL	11 mL	11 mL
Temed	7 µL	7 µL	7 µL
APS	52 µL	52 µL	52 µL

Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 10 min gefärbt. Die Entfärbung erfolgte für 15 min in 1 x TAE-Puffer. Mittels UV-Strahlung wurden die DNA-Banden im Gel visualisiert.

Die Extraktion von DNA-Banden aus DGGE-Gelen wurde mit einer Skalpellklinge unter UV-Licht ausgeschnitten und in 1,5 mL Reagenzgefäße, das mit 20 µL H₂O_{dest} befüllt wurde, überführt. Die Probe wurde bei 4 °C über Nacht (ÜN) aufbewahrt. Im Anschluss wurde eine Reamplifikation mit entsprechenden Primerpaaren durchgeführt. Hierzu wurden 5 µL als Matrize in PCR-Reaktionen eingesetzt und die PCR-Produkte mittels Gel/ PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) aufgereinigt. Eine Größenkontrolle der reamplifizierten PCR-Produkte wurde durchgeführt (siehe 3.5.3) und zum Schluss zur Sequenzierung verschickt (3.12).

3.7 Ökophysiologische Untersuchungen

3.7.1 Nicht invasive Sauerstoffmessung

Zur Bestimmung der Photosyntheseleistung der Mikroalgen bzw. des Sauerstoffverbrauchs der ALBA-Flocken wurde die Sauerstofffreisetzung der Mikroalge *C. vulgaris* und der ALBA-Flocken mit einer nicht invasiven Methode gemessen. Hierfür wurde eine O₂-Optode (oxygen sensor spot, PreSens, Regensburg, Deutschland) mit Silikonklebstoff an die Innenseite einer 120 mL Winklerflasche geklebt. Mittels eines passenden Glasstopfens mit Schliff wurde die Flasche luftdicht verschlossen. Zur besseren Gas-Verteilung wurde während der Messungen

die Lösung mit einem Rührfisch durchmischt. Die Kalibrierung der Optode erfolgte nach Anweisungen des Herstellers. Der 0 %-Punkt wurde in einer Natriumsulfitlösung (1g Na_2SO_3 in 100 mL) gemessen. Der 100 %-Punkt wurde in destilliertem Wasser, das 10 min mit Umgebungsluft durchlüftet worden war, durchgeführt. Die Messung des gelösten Sauerstoffs in der Probe erfolgte durch eine optische Anregung des Farbstoffes in der Sensormembran. Das Messprinzip beruht auf der Abnahme der Lumineszenz der Sensormembran verursacht durch die Gegenwart von molekularem Sauerstoff (siehe Abb. 5). Die Anregung der Membran und die Messung der Lumineszenz erfolgten computergesteuert über ein Glasfaserkabel. PSt3-Sensormembran, Fibox 3 und die Software (Oxyview-PSt3-V5.20) stammen von der Firma PreSens.

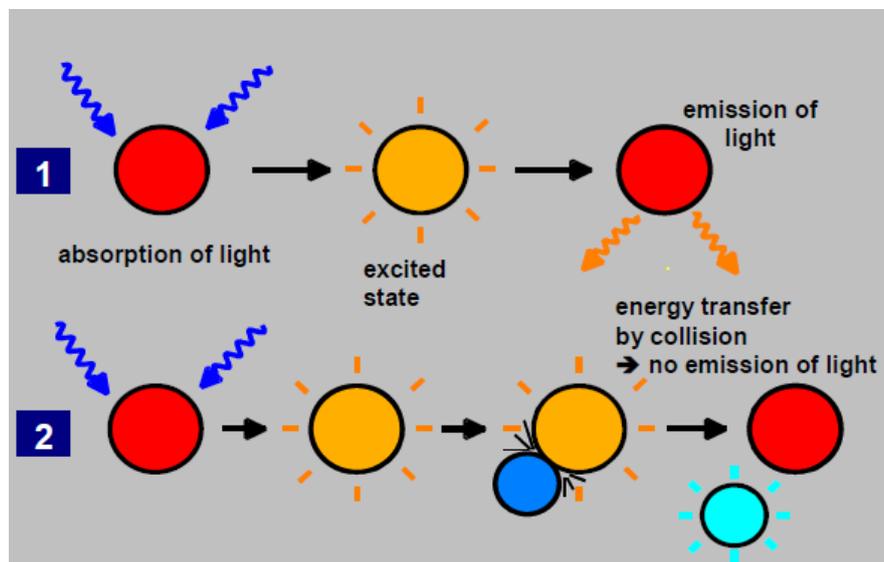


Abb. 5: Prinzip der dynamischen Kollisionslöschung (Collisional Quenching) durch molekularen Sauerstoff. (1) Lumineszenz-Prinzip in Abwesenheit von Sauerstoff. (2) Deaktivierung des Lumineszenzindikatormoleküls durch molekularen Sauerstoff (Presens 2006).

Mit der nicht invasiven Sauerstoffmessung wurden zum einen unterschiedliche O_2 -Konzentrationen in den *C. vulgaris* Kulturen und die resultierende Photosyntheseleistung anhand von Photosynthese-Licht-Kurven (PI-Kurven) untersucht. Zum anderen wurde die Sauerstofffreisetzung/Zehrung der ALBA-Flocken während der Abwasserreinigung aufgenommen. Zum Beginn der Messungen bezüglich der Photosyntheseleistung, wurde der Sauerstoff der eingesetzten Probe mit Argon aus dem Gefäß ausgegast. Anschließend wurde eine Spatelspitze Bicarbonat (NaHCO_3) in die Probe hinzugeführt. Dies stellt die Versorgung mit CO_2 sicher ($\text{CO}_2 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{CO}_3^{2-}$), da im Säuren das Bicarbonat das Gleichgewicht in die Richtung des CO_2 verschiebt. Als Lichtquelle wurde ein Diaprojektor mit verschiedenen Filtern für unterschiedliche Lichtintensitäten, durch 15 Abstufungen zwischen 0 und $1015 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ verwendet und mit einem Quantenmeter (Li-250, LI-COR

Inc., Nebraska, USA) der mit einem Micro-Quatum-Sensor (US-SQS/L, Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany) ausgestattet war, kontrolliert. Es wurden folgenden Lichtintensitäten mittels Filter für die unterschiedliche *C. vulgaris* Konzentrationen eingestellt: 0, 2, 12, 50, 95, 150, 200, 250, 290, 370, 480, 585, 710, 800, 905, 1015 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Die Lichtintensitäten wurden im Gefäß ermittelt. Bei den ALBA-Flocken wurden Photonenflußraten mit 0, 50, 95, 196, 286, 466, 697, 897, 1000 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ eingestellt. Fünf Minuten lang wurde die Probe mit jeder Lichtintensität bestrahlt und anschließend die nachfolgend höhere Intensität verwendet.

Der Verlauf der PI-Kurven ist durch eine typische Sättigungskurve charakterisiert. Unterhalb der minimal erforderlichen Strahlungsintensität (Lichtkompensationspunkt, I_c) ist keine positive Photosyntheserate möglich. In diesem Bereich verbrauchen Algen mehr Energie für ihren Erhaltungsstoffwechsel, als sie dem Licht entnehmen können. Mit zunehmender Lichtintensität steigt die Photosyntheserate linear an und nähert sich nach einem Übergangsbereich einem nahezu konstanten Endwert. Bei weiterem Anstieg der Lichtintensität wird die Biomassenzunahme bzw. Elektronentransportrate wieder geringer (Photoinhibition).

Die einzelnen PI-Kurven konnten mit Hilfe des Anstiegs der Sauerstoffproduktion durch die jeweiligen Lichtintensitäten erstellt werden. Anschließend wurden die Photosyntheseparameter α (Steigung), I_k (Lichtsättigungspunkt) und P_{max} (maximale Photosyntheseleistung) der aufgenommenen PI-Kurve mit Hilfe des Modells nach Jassby & Platt (1976) berechnet.

3.7.2 O₂-Mikrosensoren in Nadelbauweise

Zusätzlich zur nicht invasiven Sauerstoffmessung, wurde auch O₂- Mikrosensoren in Nadelbauweise für die Algen-Bakterien-Biofilmflocken verwendet. Mit dem Nadel-Sauerstoff-Mikrosensor ist es möglich Sauerstoffverteilungsprofile in Biofilmen mit einer hohen räumlichen Auflösung zu messen, um somit potentielle Sauerstoffreservoirs in den Biofilmen zu ermitteln. Die sauerstoffempfindliche Spitze einer optischen Faser ist in einer Edelstahlnadel geschützt. Dieses Design ist optimal für ein leichtes Eindringen in Proben. Anschließend wird die Sensorspitze zur Messung verlängert. Needle-Type Housing Fiber-Optic Oxygen Microsensor, Microx 4 und die Software (PreSens Datamanager) stammen von der Firma PreSens (Regensburg, Deutschland).

3.7.3 Puls-Amplituden-Modulation-Messung (PAM)

Positive oder negative Auswirkungen auf die photosynthetische Aktivität der Mikroalge nach den Desintegrationsbehandlungen (3.73.8.1) und während der Abwasserreinigung wurden unter Verwendung eines IMAGING-PAM M-Serie Chlorophyll Fluorometer (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Deutschland) analysiert. Die maximale Quantenausbeute von PSII, definiert als F_v / F_m , wurde nach der folgenden Gleichung berechnet:

$$F_v / F_m = \frac{F_m - F_0}{F_m}$$

F_v ist die variable Fluoreszenz, F_m die maximale Fluoreszenz und F_0 die minimale Fluoreszenz. Nach den Desintegrationsbehandlungen wurde 1 mL der Proben auf Mikrotiterplatten übertragen. Nach einer 5-minütigen Dunkeladaption wurde F_0 ermittelt und die Probe anschließend mit einem Sättigungspuls von 8000 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ für 600 ms bestrahlt. Während des Sättigungspulses ist die Fluoreszenzausbeute maximal. Das Verhältnis der variablen zur maximal Chlorophyllfluoreszenz F_v / F_m ermöglicht die Abschätzung der photosynthetischen Aktivität *in vivo* (Hanelt & Nultsch, 1995).

Bei den Desintegrationsmethoden wurden die Ergebnisse auf den prozentualen Anteil normiert, um potentielle unterschiedliche Startwerte vergleichbar zu machen.

Bei der Abwasserreinigung im Labormaßstab, wurde der Einfluss des Abwassers auf die Mikroalgen durch den photosynthetischen Aktivitätsverlauf verfolgt.

Das Dual PAM 100 (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany) wurde für die Untersuchung der Anpassung der Mikroalgenkulturen mit unterschiedlichen Zelldichten an gleichbleibende Kultivierungslichtintensität von *C. vulgaris* und die Abhängigkeit der Elektronen-Transportrate (ETR) des Photosystems II von dieser Lichtintensität untersucht. Beim Dual Pam wurde ein Sättigungspuls von 10.000 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ für 600 ms, eingestellt.

Durch die Messpunkte wurde eine nichtlineare Regressionsfunktion gelegt und mit Hilfe eines Modells (Jassby & Platt 1976) die Parameter α (Steigung), I_K (Lichtsättigungspunkt) und ETR_{max} berechnet.

3.8 Desintegrationsassay für ALBA-Flocken

Da es bisher unmöglich war, Algen und Bakterien quantitativ aus ALBA-Flocken zu bestimmen, wurden neue Methoden evaluiert. Im ersten Schritt wurde die kompakte Form der Flocken schonend getrennt, um weitere Analyse beider Komponenten des ALBA-Systems durchzuführen. Ein neues Verfahren wurde zudem entwickelt, um diese Quantifizierung photometrisch zu erreichen.

Für eine photometrische Quantifizierung der Algen- und Bakterien-Anteile in einer Mischprobe aus ALBA-Flocken wurden zunächst vier Desintegrationsmethoden für eine schonende Trennung untersucht:

- a) biologische Behandlung mittels Enzymen,
- b) chemikalische Behandlung mittels Formaldehydlösung,
- c) mechanisch Trennung mittels Glasperlen und
- d) physikalische Trennung mittels Beschallung.

3.8.1 Desintegrationsmethoden

Die biologische Trennung wurde mit Hilfe von Enzymen durchgeführt. Dazu wurde zu einer ALBA-Flocken Probe α -Amylase (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland, CAS-NO: 9000-85-5): Phospholipase D (9001-87-0 Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland, CAS-NO) DNase I (AppliChem, CAS-NO: 9003-98-9) und Proteinase K (AppliChem, CAS-Nr: 39450-01-6) mit jeweils einer definierten Konzentration von 1 g L^{-1} zugesetzt. Jede Enzymlösung wurde in 15 Minuten Intervallen zu der Probe hinzugefügt und durchgehen bei 37° C mit 200 rpm geschüttelt. Nach 60 Minuten wurden die Tests beendet und der Desintegrationserfolg bestimmt.

Die chemische Behandlung erfolgte mittels Formaldehyd und NaOH. Dabei wurden unterschiedliche Formaldehyd Endkonzentration untersucht. 20 mL Aliquots der ALBA-Flocken wurde mit 0,12 mL, 0,34 mL und 0,57 mL einer 36,5%-igen Formaldehyd Lösung für 1 h bei 4° C behandelt und anschließend mit 8 mL NaOH (1 M, 4° C , 3 h) versetzt (Liu und Fang 2002). Die Endkonzentration von Formaldehyd betrug 0,2 %, 0,6 % und 1 %. Nach dem Zufügen der Chemikalien wurden die Proben bei 100 rpm für 4 Stunden geschüttelt. Jede Stunde wurden 3 mL für den quantitativen Desintegrationsbestimmung (3.8.2) entnommen.

Die mechanische Behandlung wurde mit Hilfe eines Homogenisators (Thermo Savant FastPrep® 120 Cell Disrupter, Thermo Scientific, USA) durchgeführt. Es wurden drei verschiedene Glasperlengrößen (1, 2 und 3 mm Durchmesser) mit konstanter Geschwindigkeit von 4 m s^{-1} und unterschiedlichen Laufzeiten von 40, 80 und 120 Sek. getestet. Die Frequenz lag bei 60 Hz. In die 2 mL Mikroschraubröhrchen wurden von den 1 mm Kugeln 0,5 g, von den 2 mm Kugel 0,6 g und von den 3 mm Glaskugeln 0,53 g zugegeben.

Bei der physikalischen Behandlung wurde das Ultraschallgerät UP200S (Hielscher Ultraschall Technology) bei einer Arbeitsfrequenz von 24 kHz verwendet. Für die

Ultraschallbehandlungen wurden 5 mL der ALBA-Bakterien-Flocken Probe periodisch 0,5, 2, 6 und 10 min mit einer Regelmäßigkeit von 2 Hz in einem 13 mL-Falcon-Röhrchen beschallt. Zusätzlich wurden drei unterschiedliche Ultraschalleistungsintensitäten untersucht 40, 80 und 120 W (8, 16 und 24 W mL⁻¹). Während der Behandlung wurde die Probe auf Eis gekühlt.

Alle Experimente wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt.

3.8.2 Bestimmung des Desintegrationsgrades

Der Grad der Desintegration wurde nach jeder Behandlung quantifiziert. Der Desintegrationsgrad wurde wie folgt ermittelt:

3 mL behandelte Probe wurde auf ein 35 µm Sieb überführt. ALBA-Flocken die größer als 35 µm waren blieben auf dem Sieb zurück. Der zurückgehaltene Anteil auf dem Sieb wurden mit einer 0,9% Natriumchlorid Lösung auf einen 0,2 µm Membranfilter überführt (Cellulosenitrat-Membran, 47 mm Durchmesser, Sartorius) und anschließend die TS bestimmt. Der Anteil der Flocken, der das 35 µm Sieb passiert hatte, wurde auch auf einem 0,2 µm Filter erfasst und die TS bestimmt. Das Prinzip ist in Abb. 6 veranschaulicht.

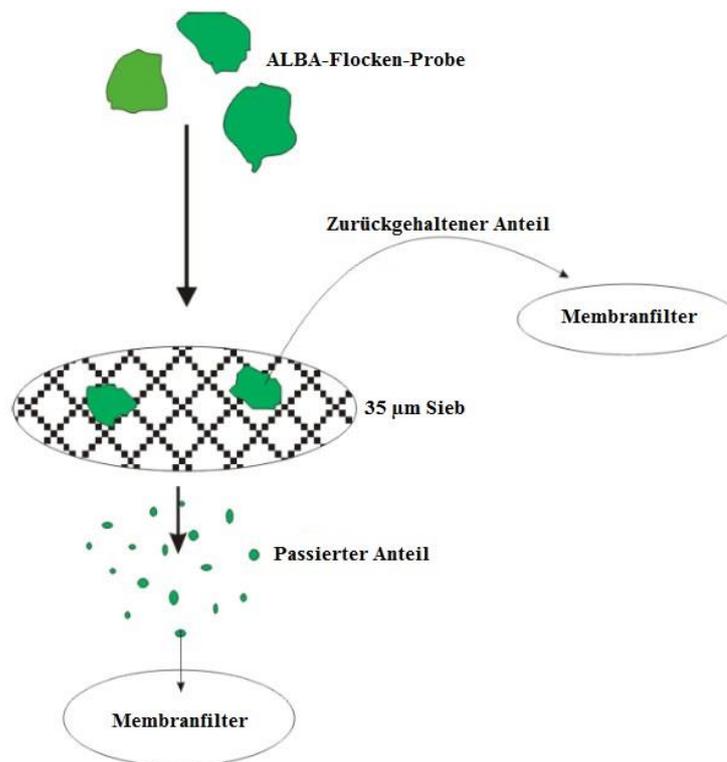


Abb. 6: Ablauf zur quantitativen Bestimmung des Desintegrationsgrades.

Der Desintegrationsgrad der jeweiligen Methode wurde durch das Trockengewicht des passierten Anteils (TS_p) und des Gesamt-Trockengewichts ($TS_{gesamt\ z+p}$) berechnet.

$$\text{Desintegration [\%]} = \frac{\text{TS}_p[\text{g}]}{\text{TS}_{\text{gesamt z+p}}[\text{g}]} * 100$$

TS_z =zurückgehaltener Anteil

TS_p =passierter Anteil

$\text{TS}_{\text{gesamt z+p}}$ =Gesamt-Trockengewicht

3.9 Quantifizierungsassay von ALBA-Flocken

Für die photometrische Quantifizierung von Algen- und Bakterienanteilen in einer Mischprobe wurde mit MATLAB® eine Methode programmiert. Mittels des Absorptionsspektrums der Algen und Bakterien (Wellenlänge von 320 nm bis 800 nm, 5 nm Schritte) sollte das Verhältnis beider Komponenten bestimmt werden.

Die mathematische Grundlage, des verwendeten Gleichungssystems, basiert auf dem linearen Zusammenhang zwischen der Konzentration c und der Extinktion E einer Substanz. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz gilt für die Extinktion bei einer Wellenlänge folgende Gleichung:

$$E = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

Festzuhalten ist, bei konstantem Extinktionskoeffizienten ε und konstanter Küvettenbreite d , dass die Extinktion E proportional mit der Konzentration c zunimmt. Dabei entspricht I_0 der Intensität des eingestrahlichten Lichts einer bestimmten Wellenlänge und I der transmittierten Lichtintensität.

Der Verlauf der Absorptionsspektren (320nm – 800 nm) der Mikroalge *C. vulgaris* und der Bakterien ist charakteristisch unterschiedlich (siehe Abb. 32). Damit sind die Spektren linear unabhängig voneinander. Zusätzlich kommt hinzu, dass bei Mischproben (Algen und Bakterien) die Absorptionsspektren sich additiv überlagern. Es gilt also:

$$E_{\text{Gesamt},\lambda} = E_{\text{Algen},\lambda} + E_{\text{Bakterien},\lambda} = (\varepsilon_{\text{Algen},\lambda} \cdot c_{\text{Algen}} + \varepsilon_{\text{Bakterien},\lambda} \cdot c_{\text{Bakterien}}) \cdot d$$

Dies gilt für alle Wellenlängen, jedoch variieren die Extinktionskoeffizienten je nach Wellenlänge. Damit entsteht ein überbestimmtes lineares Gleichungssystem.

Matrixschreibweise:
$$\begin{pmatrix} E_{320 \text{ nm}} \\ \vdots \\ E_{800 \text{ nm}} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \varepsilon_{\text{alg},320 \text{ nm}} & \varepsilon_{\text{bakt},320 \text{ nm}} \\ \vdots & \vdots \\ \varepsilon_{\text{alg},800 \text{ nm}} & \varepsilon_{\text{bakt},800 \text{ nm}} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} c_{\text{alg}} \\ c_{\text{bakt}} \end{pmatrix} \cdot d$$

Kurschreibweise:
$$\vec{E} = \vec{\varepsilon} \cdot \vec{c} \cdot d$$

3.9.1 MATLAB® Matrix

Für die Bestimmung der Verhältnisse wurden zunächst zwei Modelle für die Extinktionskoeffizientenmatrix $\vec{\epsilon}$ in MATLAB® ausgewählt (Datensatz siehe Anhang).

Die erste Matrix wurde aus den Extinktionswerten der Reinkulturproben von Algen und Bakterien kalibriert. Dafür wurden die Extinktionen (320- 800 nm) der jeweiligen Reinkultur und der Trockensubstanzgehalt bestimmt. Somit sind aus der Gleichung die Parameter E, c und d bekannt und die Bestimmung der einzelnen Extinktionskoeffizienten der Algen und Bakterien konnten durchgeführt werden. In weiteren wird diese Matrix als Koeffizientenmatrix 1 genannt.

Die zweite Matrix wurde anhand von Extinktionswerten von Algen-Bakterien-Mischproben, deren Zusammensetzung bekannt war, kalibriert. Dafür wurden aus Algen- und Bakterienreinkulturen, die Algen-Bakterien-Verhältnisse 0,25:1, 0,5:1, 1:1, 1,5:1, 2:1 und 3:1 eingestellt. Anschließend wurden für die eingestellten Verhältnisse die Absorptionsspektren gemessen. Diese Matrix wird im weiteren Verlauf als Koeffizientenmatrix 2 genannt.

Somit wurde mit Hilfe beider Matrixmodelle $\vec{\epsilon}$ die Konzentration der Algen und Bakterien in Mischprobe aus den Absorptionsspektren bestimmt.

3.9.2 Vorbereitung der Mischprobe für die photometrische Quantifizierung

Für die photometrischen Quantifizierungsmessungen wurden Proben aus den Bioreaktoren entnommen. Für die Extinktionsmessung war es notwendig, die Algen-Bakterien-Flocken in der Probe zunächst zu desintegrieren. Die Desintegration erfolgte mittels der optimal ermittelten mechanischen Trennung durch Glaskugeln, wie in Abschnitt 3.8 beschrieben. Anschließend wurden 100 μL der desintegrierten Probe mit 1900 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ in einer 2 mL Einmalküvette vermischt und die Extinktion bei den Wellenlängen von 320 nm bis 800 nm im Spektralphotometer gemessen. Täglich wurden drei Probe entnommen und von jeder Probe wurden drei Replikate gemacht. Zusätzlich wurde der Trockensubstanzgehalt bestimmt.

3.10 Physikalisch- und chemische Analysen

Im Folgenden werden die Methoden zur Analyse der Flüssig- und Feststoffphasen beschrieben.

3.10.1 Nährstoffanalyse mittels Hach Lange Küvettentests

Im Rahmen der Arbeit wurden während der Abwasserreinigung folgende Abwasserinhaltsstoffe (Tab. 7) mittels Küvettentests der Firma Hach Lange GmbH untersucht. Hierfür wurde die Probe 10 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert und anschließend wurde der Überstand mit Hilfe eines Celluloseacetat Spritzenfilters (Porengröße 0,45 µm) in ein Falconreaktionsgefäß überführt, um nicht gelöste Substanzen zurückzuhalten. Für die anschließende photometrische Nährstoffbestimmung wurde das Filtrat verwendet.

Tab. 7: Übersicht über die verwendeten Küvettentests für die Wasseranalysen.

Parameter	Küvetten Test Typ	Messbereich
Chemischer Sauerstoffbedarf (CSB)	LCK 314	15 - 150 mg L ⁻¹ O ₂
Chemischer Sauerstoffbedarf (CSB)	LCK 514	100 - 2000 mg L ⁻¹ O ₂
Ammonium	LCK 304	0.015 - 2.0 mg L ⁻¹ NH ₄ -N
Nitrat	LCK 339	0.23 - 13.5 mg L ⁻¹ NO ₃ -N
Nitrit	LCK 341	0.015 - 0.6 mg L ⁻¹ NO ₂ -N
Phosphat	LCK 349	0.05 - 1.5 mg L ⁻¹ PO ₄ -P
Sulfat	LCK 153	40 - 150 mg L ⁻¹ SO ₄
Chlorid	LCK 311	1 - 1000 mg L ⁻¹ Cl

Der CSB Abbaugrad wurde aus dem CSB-Gehalt in der Nachklärung bezogen auf den CSB-Gehalt des Zulaufs berechnet. Damit ermittelt man die Degradierungseffizienz des Abbaus eines Systems (siehe folgende Gleichung):

$$CSB_{Abbaugrad} [\%] = 100 - \left(\frac{CSB \text{ Gehalt}_{Nachklärung}}{CSB \text{ Gehalt}_{Zulauf}} * 100 \right)$$

3.10.2 Isolierung von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) aus Algen-Bakterien-Flocken

Die Isolierung der EPS aus den ALBA-Flocken wurde durchgeführt, um anschließend den Protein-, Kohlenhydrat- und Lipidgehalt zu bestimmen. Dabei erfolgte die Isolierung der EPS in Anlehnung an Wingender et al. (2001). Die zu untersuchende Probe wurde in einem Verhältnis von 1:16 (w/v) in 0,14 M NaCl-Lösung suspendiert und unter Rühren bei Raumtemperatur für 60 Minuten homogenisiert. Im Anschluss wurde die Suspension für 30 Minuten bei 20.000 x g und 10°C zentrifugiert. Der erhaltende Überstand wurden mittels einem Celluloseacetat Filter (Porengröße 0,20 µm) steril filtriert. Das Filtrat wurde sofort

weiter für die Bestimmung des Protein-, Kohlenhydrat- und Lipidgehaltes (3.10.3; 3.10.4; 3.10.5) verwendet.

3.10.3 Bestimmung von Proteinen

Der Nachweis des Proteingehaltes erfolgte kolorimetrisch nach einer von Frølund et al. (1996) modifizierten Methode von Lowry et al. (1951). Das Prinzip beruht auf der Biruet-Reaktion von Peptidbindungen mit Cu^{2+} -Ionen. Durch die Zugabe von Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz wird das Cu (II) zu Cu (I) reduziert und somit eine sensitivere Farbreaktion bewirkt. Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurden zu 0,5 mL zellfreier EPS-Probe 0,7 mL Lowry-Reagenz hinzugegeben und gemischt. Nach einer 10 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden 0,1 mL Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz hinzugegeben und sofort gemischt. Nach einer 45 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben bei 750 nm photometrisch gemessen. Die Proben wurden dreifach angesetzt.

Für die Proteinbestimmung erfolgte der Konzentrationsabgleich gegen eine Eichgrade, die mit Konzentrationen von BSA hergestellt wurde (Abb. 7).

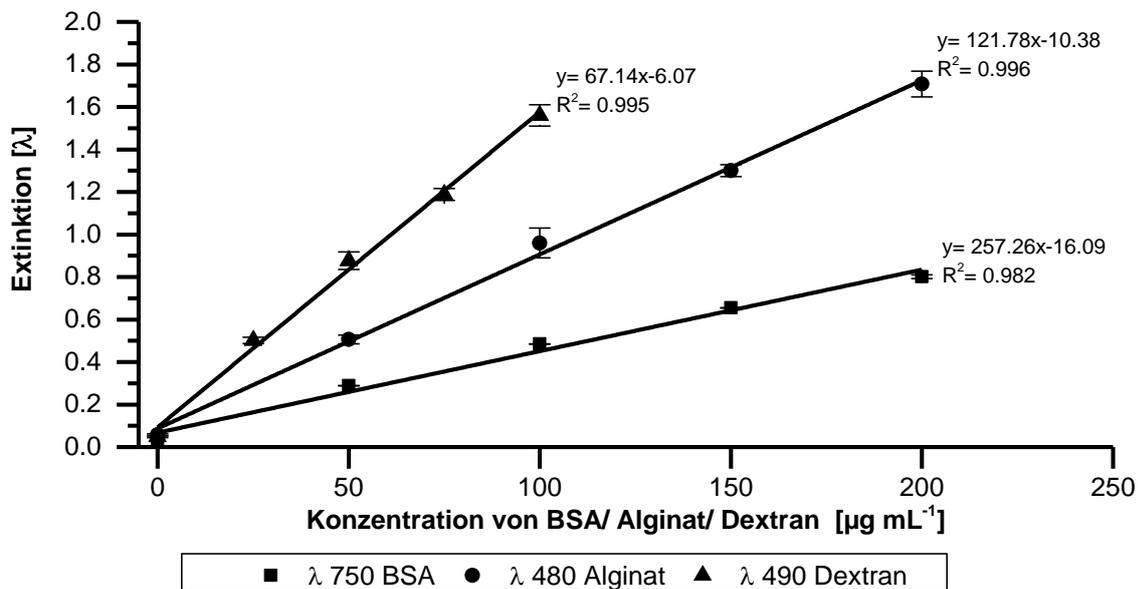


Abb. 7: Kalibriergerade zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen (■), sauren Polysacchariden (●) und von neutralen Polysacchariden (▲). Die BSA-Konzentrationen, 0 μg mL⁻¹, 50 μg mL⁻¹, 100 μg mL⁻¹, 150 μg mL⁻¹ und 200 μg mL⁻¹ wurden gegen die Extinktionsmessungen (bei OD₇₅₀) aufgetragen. Die Alginat-Konzentration, 0 μg mL⁻¹, 50 μg mL⁻¹, 100 μg mL⁻¹, 150 μg mL⁻¹ und 200 μg mL⁻¹ wurden gegen die Extinktionsmessungen (bei 480nm) aufgetragen. Die Dextran-Konzentration, 0 μg mL⁻¹, 25 μg mL⁻¹, 50 μg mL⁻¹, 75 μg mL⁻¹ und 100 μg mL⁻¹ wurden gegen die Extinktionsmessungen (bei 490nm) aufgetragen.

Tab. 8: Übersicht der verwendeten Lösungen zur Bestimmung des Proteingehalts.

Lösungen	Konzentration
Lösung 1: Natriumhydroxid [NaOH]	0,143 M
Natriumcarbonat [Na ₂ CO ₃]	0,270 M
Lösung 2: Kupfersulfat [CuSO ₄]	0,057 M
Lösung 3: Natriumtartrat-Dihydrat [C ₄ H ₄ Na ₂ O ₆ x 2 H ₂ O]	0,124 M
Lowry-Reagenz: Lösung 1, 2 und 3 wurden im Volumenverhältnis 100:1:1 gemischt.	
Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz (Fa. Merck) wurden 5:6 mit destilliertem H ₂ O verdünnt.	
Rinderserumalbumin (Fa. Sigma)	200 µg mL ⁻¹

3.10.4 Bestimmung von Kohlenhydraten

Die Bestimmung von Kohlenhydraten erfolgte kolorimetrisch mittels eines Phenol-Schwefelsäure-Tests nach Dubois et al. (1956). Durch die saure Hydrolyse werden die glykosidischen Bindungen der Oligo- und Polysaccharide gespalten und dehydriert. Entstandene Furfural Derivate kondensieren mit zwei Phenolmolekülen zu einem orangefarbenem Triarylmethan Derivat. Bei der Kohlenhydratbestimmung wurden zu 0,5 mL zellfreie EPS-Probe 0,5 mL Phenol-Lösung zugefügt und durchmischt. Anschließend wurden 2,5 mL konzentrierte Schwefelsäure hinzugegeben und gemischt. Nach einer 10 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Ansätze im Wasserbad bei 30 °C für 15 Min erhitzt. Nach einer weiteren 5 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben im Photometer zum einem bei OD₄₈₀ nm für saure Polysaccharide (z. B. Alginat) und bei OD₄₉₀ nm für neutrale Polysaccharide (z. B. Dextran) gemessen. Die Proben wurden dreifach angesetzt. Für die Kohlenhydratbestimmung erfolgte der Konzentrationsabgleich gegen erstellte Eichgraden, die mit Konzentrationen von Alginat für saure Polysaccharide und Dextran für neutrale Polysaccharide hergestellt wurde (Abb. 7).

Tab. 9: Übersicht der Lösungen für den Nachweis von Kohlenhydraten.

Reagenzien	Konzentration
Schwefelsäure	96 %
Phenol-Lösung	5 % (w/v)
StammLösung: Dextran	100 µg/mL
Alginat	200 µg/mL

3.10.5 Bestimmung des Gesamt-Lipidgehaltes

Der Nachweis des Lipidgehalts erfolgte gravimetrisch nach vorangegangener Extraktion mit lipophilem Lösungsmittel. Als Extraktionsmittel wurden in Anlehnung an Hara & Radin (1978) (n)-Hexan: Isopropanol (3:2 v/v) eingesetzt. Hierzu wurden 0,5 mL der zu analysierenden EPS-Probe mit 0,5 mL (n)- Hexan/ Isopropanol schüttelnd 30 Min. bei RT homogenisiert. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation für 90 Sek. bei 12.000 x g. Nach der Extraktion wurde die obere Phase (Hexan und Lipide) der Lösung in ein zuvor abgewogenes Glasgefäß überführt und über Nacht unterm Abzug abgedampft. Anschließend wurde der Lipidgehalt gravimetrisch ermittelt.

3.10.6 Bestimmung des Pigmentgehalts Chlorophyll a / b

Die photometrische Pigmentbestimmung von Chlorophyll a und b nach Barnes et al. (1992) erfolgte nach einer Dimethylsulfoxid (DMSO) Extraktion. Dazu wurde 5 mL Probe durch einen Glasfaserfilter (Whatman GF/C, 47 mm Durchmesser, 1,2 µm Porengröße) unter Vakuum filtriert. Anschließend wurde der Filter in ein Falconreaktionsgefäß überführt und mit 8 mL DMSO versetzt. Nach einer 10 minütigen Inkubation bei 70 °C im Wasserbad, erfolgte die Nachextraktion bei Raumtemperatur im Dunkeln. Zur Trennung der Feststoffe wurden die Proben 8 min bei 4000 rpm zentrifugiert und anschließend im Photometer bei den Wellenlängen 665 und 648 gemessen. Nach Barnes et al. (1992) wurde die Konzentration von Chlorophyll a und b mittels folgenden Gleichungen berechnet. Die drei Berechnungen wurden entsprechend dem eingesetzten Extraktionsmittelvolumen zu Probevolumen angepasst.

$$\text{Chlorophyll}_a [\mu\text{g mL}^{-1}] = 1,6 * (14,85 \times \lambda_{665} - 5,14 \times \lambda_{648})$$

$$\text{Chlorophyll}_b [\mu\text{g mL}^{-1}] = 1,6 * (25,48 \times \lambda_{648} - 7,36 \times \lambda_{665})$$

$$\text{Chlorophyll}_{a+b} [\mu\text{g mL}^{-1}] = 1,6 * (7,49 \times \lambda_{665} - 20,34 \times \lambda_{648})$$

3.10.7 Trockensubstanz (TS)

Die Trockensubstanz des Algenmaterials und des ALBA-Materials erfolgte gravimetrisch nach der DIN 38409 H2-2. Dazu wurde zuvor ein Glasfaser Filter (Whatman GF/C, GE Healthcare Europe GmbH, England) mit einem Porendurchmesser von 1,2 µm bei 105°C getrocknet und gewogen. Im Anschluss wurde die Probe mit Hilfe einer Vakuumpumpe durch den Filter filtriert. Der Filter wurde nochmal bei 105 °C getrocknet und gewogen. Die Proben für die TS-Bestimmung wurden aus durchmischten Reaktoren entnommen. Die Trockensubstanz der Probe wurde mit der folgenden Gleichung berechnet.

$$TS [g L^{-1}] = (\text{Filter}_{\text{voll}} - \text{Filter}_{\text{leer}}) \times \frac{1000 \text{ mL}}{\text{Volumen der Probe}}$$

3.10.8 Optische Dichte (Extinktion)

Die Messung der optischen Dichte zur Bestimmung der Biomassenkonzentration der Algensuspension erfolgte mit einem Spektralphotometer (DR3900, Hach Lange GmbH, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 750 nm.

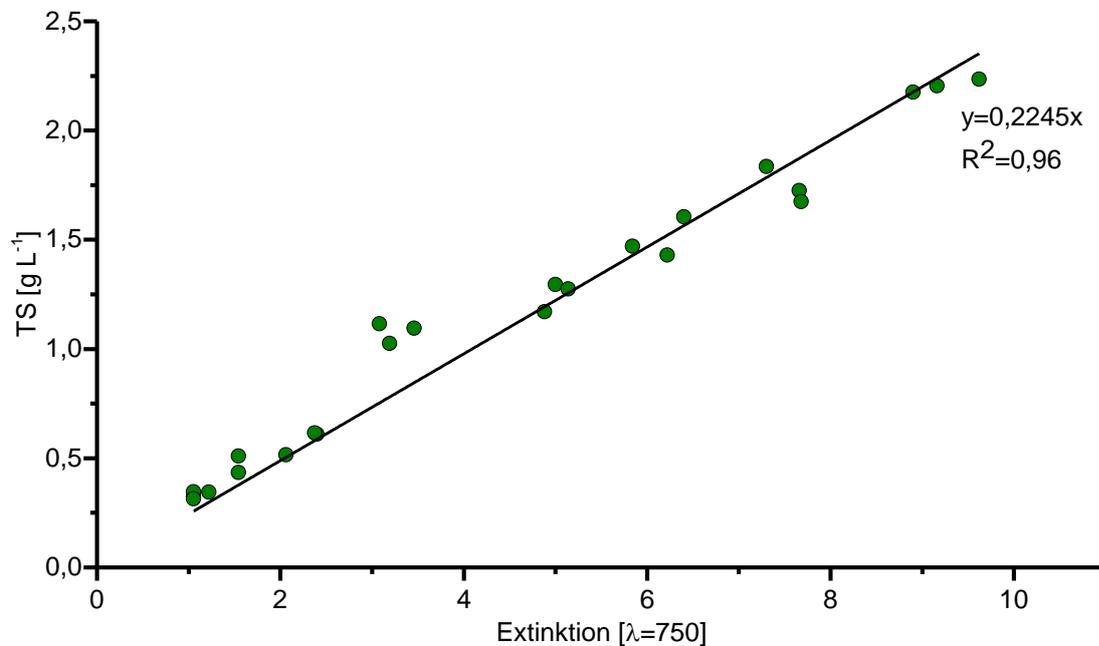


Abb. 8: Erstellter Korrelationsfaktor zwischen der Extinktion und der Trockensubstanz bei *Chlorella vulgaris*. Die Trockensubstanz wurde gegen die Extinktionsmessungen (bei OD_{750}) aufgetragen. Eine lineare Kurvenanpassung wurde durchgeführt.

3.11 Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie ermöglicht eine detaillierte Analyse der Oberflächenstruktur von Mikroorganismen. Mittels eines Elektronenstrahls wird die Oberfläche abgetastet. Die Wechselwirkung der Elektronen mit dem Objekt führt zur Erzeugung eines Bildes. In der Regel können nur leitende Oberflächen dargestellt werden, somit muss die Oberfläche der biologischen Proben mit einem Metallfilm z. B. Gold überzogen werden. Mit einem Rasterelektronenmikroskop ist eine 100.000-fache Vergrößerung erreichbar.

3.11.1 Behandlung der Zellen: Fixierung und Dehydrierung

Die ALBA-Flocken Probe wurde in 500 μl PBS Puffer (NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1,8 mM; pH:7,3) resuspendiert und in Körbchen mit Zigarettenpapier überführt. Die anschließende Fixierung und Entwässerung der Proben wurde nach dem

3.11.3 Präparation und Bedampfung

Die Probenkörnchen wurden vorsichtig auf Aluminiumträger, sogenannte Stubs, mit doppelseitig klebenden Kohle-Tabs, verstrichen. Anschließend wurden die Stubs frontal mit Gold mit einer Schichtdicke von 25 nm bedampft (BAL- TEC; SCB 050 Sputter Coater) und anschließend mit einem Rasterelektronenmikroskop (Leo1530) angeschaut.

3.12 Sequenzierung

Zur Überprüfung von Gensequenzen wurden PCR-Produkte von der Firma Eurofins MWG GmbH (Ebersberg, Deutschland) sequenziert.

Die MiSeq/Illumina Sequenzierung wurde am Heinrich-Pette-Institut (HPI) in Hamburg nach dem Protokoll der MiSeq-Plattformen durchgeführt. Die PCR wurde mittels des Primersatzes 515F und 806R durchgeführt: Dabei bekam der reverse Primer verschiedene Barcode-Sequenzen. Die Amplikons lagen bei einer Länge von ca. 350 bp. Die PCR-Reaktionen erfolgten in 50 µL-Ansätzen und wurden auf Eis wie folgt pipettiert: 25 µL vom OneTaq® 2x Master Mix mit Standard Puffer (New England BioLabs GmbH, Frankfurt, Deutschland), 25 pmol Vorwärtsprimer, 25 pmol Rückwärtsprimer, 100 ng von der gesamt DNA und anschließend auf ein Endvolumen von 50 µl mit sterilem Wasser aufgefüllt. Die PCR Bedingungen sind in (Tab. 4c) aufgeführt. Die Produkte der Amplifikation wurden mittels Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) aufgereinigt (siehe 3.5.4.1). Die amplifizierten Gene wurden von der Illumina-Technologie nach den Anweisungen des Herstellers am HPI sequenziert.

3.13 Statistik

Ergebnisse des Desintegrationserfolgs wurden statistisch durch eine Varianzanalyse, gefolgt von einem post-hoc-Test (Tukey-HSD) oder einem nicht-parametrischen Test (Kruskal-Wallis) in Abhängigkeit von der Homogenität der Daten ausgewertet. Die Höhe des signifikanten Unterschieds wurde auf $p < 0,01$ gesetzt.

4. Ergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Abwasserreinigung mittels Algen-Bakterien-Flocken (ALBA-Flocken) zu analysieren und des Weiteren neue Möglichkeiten zu entwickeln um dieses hochkomplexe System biotechnologisch effizient zu steuern. Besondere Berücksichtigung fand dabei die Reinigungseffizienz eines ALBA-Systems, aber auch die Sauerstoffdynamik und die Diversitätsanalyse im System. Ein wesentlicher Schwerpunkt lag auf der Entwicklung einer Quantifizierungsmethode von Mischproben aus Mikroalgen und Bakterien. Ergänzende Untersuchungen zur Morphologie mittels Rasterelektronenmikroskopie sollten schließlich die enge wechselseitige Beziehung zwischen den beteiligten Bakterien und Mikroalgen visualisieren.

4.1 Abwasserreinigung mittels Algen und Bakterien

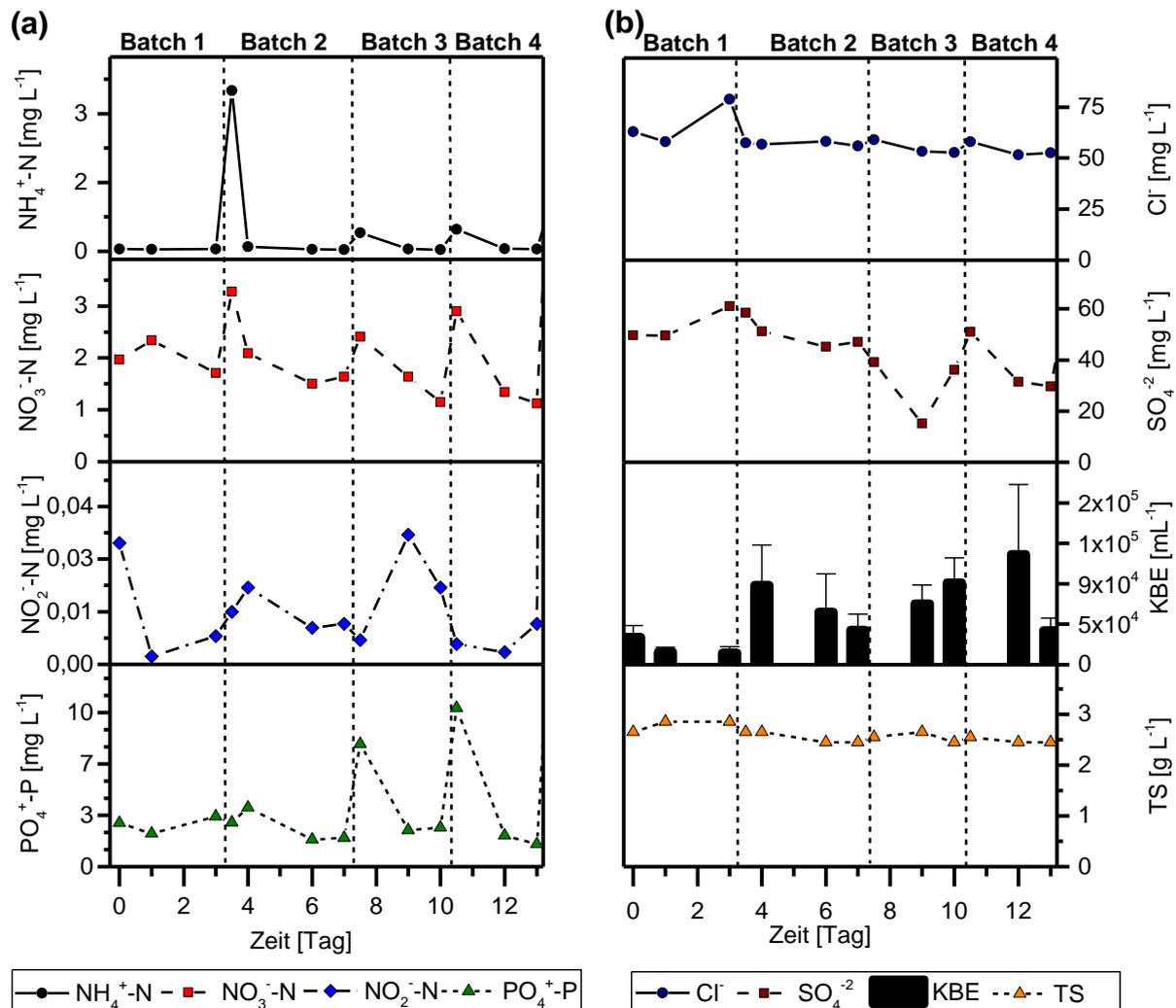
Bei der Papierproduktion entstehen große Mengen an Abwasser. Die erzeugten Abwässer können potentiell umweltschädlich sein und werden in biologischen Kläranlagen behandelt, bevor sie in die Umwelt gelangen. Für die Reinigung von Abwasser aus Papierfabriken gelten Belebungsanlagen als gut geeignet. Die am Reinigungsprozess beteiligten Mikroorganismen benötigen viel Sauerstoff, welches mit Belüftungssystemen eingebracht werden muss. Die durch die Belüftung entstehenden Kosten lassen sich reduzieren, wenn man Algen als Sauerstoffproduzenten für die Bakterien einsetzt.

Die Reinigungsleistung von ALBA-Flocken ist vom Abwassertyp und somit von der Nährstoffzusammensetzung abhängig. In dieser Arbeit wurde die Reinigungskapazität der ALBA-Flocken bezogen auf Abwasser einer Papierfabrik, welche als Rohstoff hauptsächlich Altpapier verwendet, zunächst im Labor untersucht und im weiteren Schritt auf den Pilotmaßstab übertragen. Diese sogenannten „Scale-up“ Untersuchungen wurden in Kooperation mit der Papiertechnischen Stiftung (PTS) in München bearbeitet. Die technische Umsetzung der Reinigungsanlage im Pilotmaßstab erfolgte durch die PTS.

Bakterien und Mikroalgen stehen in stetiger Wechselwirkung zueinander. Dabei wirken auch die sich ständig ändernden Umweltparametern auf die Stabilität des Konsortiums aus. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mikrobielle Gemeinschaften betrachtet, die sich in den Pilotanlagen etablierten. Ziel war es, einen Einblick in die Struktur der bakteriellen Population zu erhalten und Leitorganismen zu identifizieren.

4.1.1 Abwasserreinigung im Labormaßstab

In einem ersten Schritt wurde die Reinigung von Papierabwässern mittels ALBA-Flocken im Labormaßstab (2 L-Reaktor), über einen Zeitraum von 13 Tagen, betrachtet. Der Austausch des Abwassers erfolgte periodisch, wobei die ALBA-Flocken als Inokulum für den nächsten Ansatz zurückgehalten wurden (Repeated-Fed-Batch Verfahren). Überprüft wurde der Umsatz von Ammonium, Phosphat, Nitrit, Nitrat, Chlorid, Sulfat und mit Faktoren wie koloniebildende Einheit (KBE), Trockensubstanzgehalt, CSB-Gehalt und dem CSB-Abbaugrad in Beziehung gesetzt. Der Einsatz einer nicht invasiven Optodentechnik ermöglichte die Bestimmung und Überwachung der Sauerstoffkonzentration über den kompletten Versuchszeitraum. Nähere Information über mögliche Veränderungen der Flockenstabilität wurde über die Konzentrationsbestimmung ausgewählter Biopolymere in der EPS der ALBA-Flocken festgehalten.



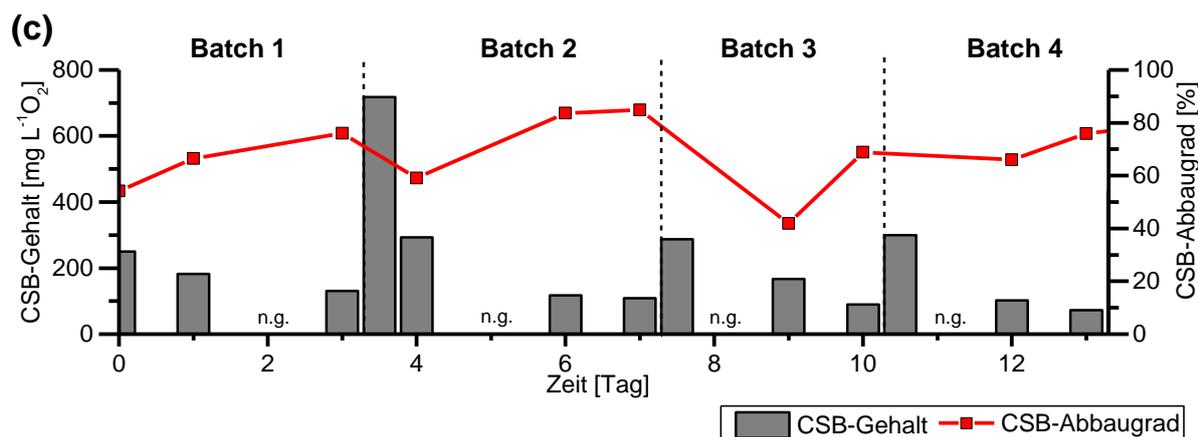


Abb. 9: Überwachung der Konzentrationen von Ammonium, Phosphat, Nitrit, Nitrat [a], Chlorid, Sulfat, KBE und des TS-Gehalts [b] sowie des CSB-Gehalts und CSB-Abbaugrades [c] im 2 L-Bioreaktor (Repeated-Fed-Batch-Verfahren) über einen Versuchszeitraum von 13 Tagen (n=1). Bei einem CSB-Wert unter ca. 100 mg L⁻¹ O₂ wurde erneut Abwasser zugeführt. Die gestrichelten, senkrecht zur Zeitachse verlaufenden Linien geben den Zeitpunkt der Zuführung an und die Einteilung in Batch Bereiche 1, 2, 3 und 4 (a, b, c). KBE Bestimmung, Mittelwert ± Standardabweichung (n=3).

In Abb. 9a wurden die Änderungen des Nährstoffgehaltes bezogen auf Ammonium, Phosphat, Nitrit und Nitrat in einem 2 L-Bioreaktor über einen Zeitraum von 13 Tagen dargestellt. Nach wiederholter Zugabe von Abwasser war der Rückgang des Ammonium- und Phosphatgehaltes erkennbar. Die durchschnittliche Ammoniumkonzentration lag bei 0,6 mg L⁻¹ des zu reinigenden Abwassers. Eine Ausnahme bildete das Abwasser des zweiten Durchlaufs (Batch), hier wurde ein Ammoniumgehalt von 4 mg L⁻¹ bestimmt. Der Phosphatgehalt des Abwassers lag in den ersten beiden Batch-Versuchen bei 2,8 mg L⁻¹, in den darauf folgenden bei 8 und 10 mg L⁻¹. Die Phosphatabbaurrate erhöhte sich vom ersten Batch mit 24% auf 54% im zweiten Batch, auf 70% und 85% in Batch 3 und 4. Die Bestimmung des Chloridgehaltes ergab einen durchschnittlichen Wert von 58±7 mg L⁻¹ in allen vier Batch-Versuchen und war im gesamten Versuch sehr konstant (siehe Abb. 9b). Der Sulfatgehalt lag in den ersten beiden Batch-Versuchen bei einem Wert von 52±6 mg L⁻¹. Im dritten Batch-Versuch sank dieser auf 15 mg L⁻¹, stieg anschließend an und blieb bei 40 mg L⁻¹. Ein eindeutiger Trend bezüglich Abnahme oder Zunahme ist nicht zu erkennen. Die Lebendzellzahlbestimmung heterotropher Bakterien (KBE) ergab eine Abnahme der Bakterienanzahl mit der Zeit in den ersten beiden und dem vierten Batch Versuch (Abb. 9b). Im dritten Batch wurde eine Zunahme detektiert. Die Anzahl der Bakterienzellen stieg jeweils nach der Erneuerung des Abwassers an. Vergleichend mit den Batch Versuchen 2, 3 und 4 (durchschnittlich 7,6x10⁴ ± 3x10⁴ mL KBE) enthielt der erste Batch-Versuch mit durchschnittlich 2x10⁴ ± 1x10⁴ mL KBE den geringsten Gehalt an heterotrophen Bakterien. Betrachtet man die Entwicklung der Biomassenproduktion ist ein stabiler Trend zu

erkennbar. Trotz der Erneuerung des Abwassers lag der TS-Gehalt über die vier Batch Versuche durchschnittlich bei $2,5 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$.

Um die Reinigungsleistung der ALBA-Biomasse im 2 L-Reaktor zu bewerten, wurde die Sauerstoffmenge, die zur Oxidation der organischen Verbindungen im Abwasser benötigt wird (Chemischer Sauerstoff Bedarf; CSB-Wert) ermittelt (Abb. 9c). Der CSB-Abbaugrad gibt Auskunft über die Degradierungseffizienz organischer Stoffe eines Systems. Der CSB-Gehalt des zugeführten Abwassers lag durchschnittlich bei 300 mg L^{-1} , mit Ausnahme im zweiten Batch (720 mg L^{-1}). Die maximale Abbaueffizienz war in den ersten beiden und letzten Batch-Versuchen am höchsten (76%, 85% und 76%). Der dritte Batch-Versuch erreichte eine Abbauleistung von 69%.

Um die Flockenstabilität der ALBA-Flocken zu charakterisieren, wurden EPS-Bestandteile der Flocken bezogen auf die Protein-, Polysaccharid- und Lipidkonzentration untersucht. Die quantitative Analyse der Protein-, Polysaccharid- und Lipidkonzentration erfolgte nach der EPS-Extraktion aus den ALBA-Flocken (Abb. 10).

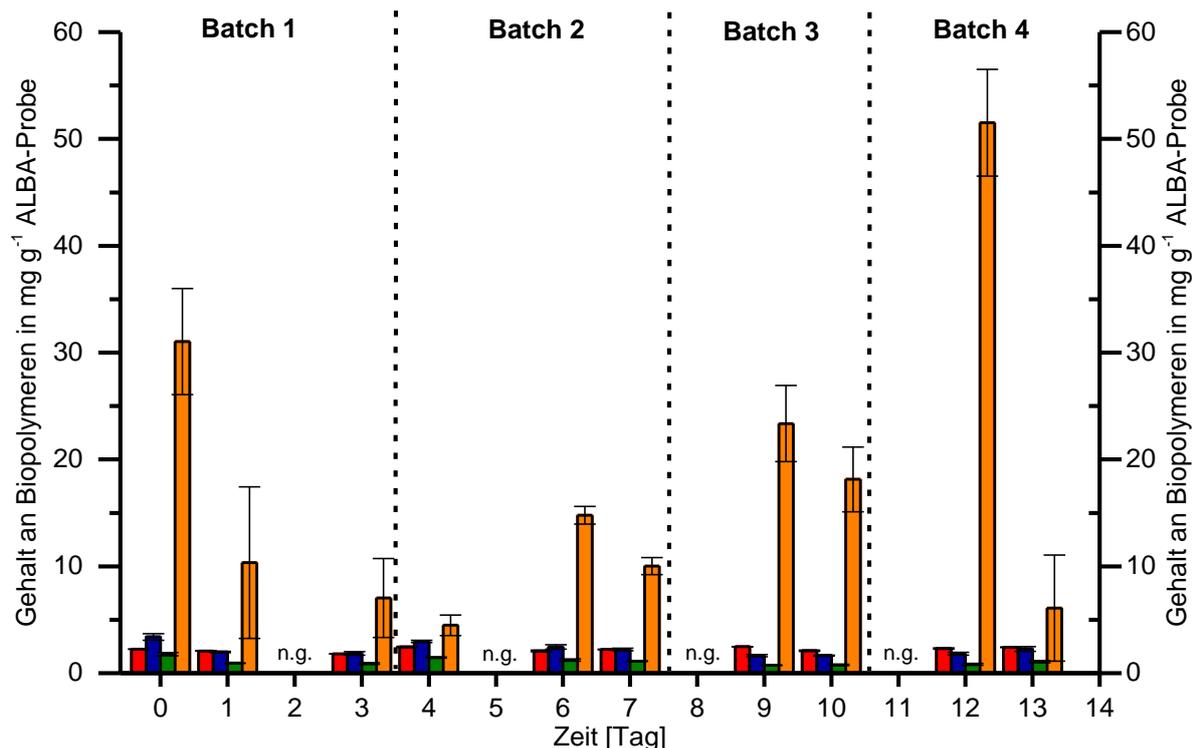


Abb. 10: Übersicht des Biopolymergehaltes der EPS aus der Abwasserreinigung im 2 L-Bioreaktor in mg g^{-1} ALBA-Probe in einem zeitlichen Verlauf von 13 Tagen. Dargestellt sind die Konzentrationen an Proteinen (■), sauren Polysacchariden (■), neutralen Polysacchariden (■) und Lipiden (■). Bei einem CSB-Wert unter $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_2$ wurde das Abwasser erneuert. Die gestrichelten, senkrecht zur Zeitachse verlaufenden Linien geben den Zeitpunkt der Zuführung von Abwasser an und die Einteilung in Batch Bereiche 1, 2, 3 und 4. Mittelwert \pm Standardabweichung ($n=3$).

Miteinander vergleichend ergaben die Messungen der EPS-Komponenten eine hohe Lipidkonzentration, ähnliche Mengen an Proteinen und sauren Polysacchariden und eine geringe Konzentration an neutralen Polysacchariden. Wie aus Abb. 10 hervorgeht, erreichten die Proteine einen durchschnittlichen Wert von $2,2 \pm 0,2 \text{ mg g}^{-1}$. Der Gehalt an sauren Polysacchariden nahm ab Versuchsstart bis zum dritten Tag von $3,3 \pm 0,3$ auf $1,8 \pm 0,2 \text{ mg g}^{-1}$ ab. Am vierten Tag stieg die Menge an sauren Polysacchariden auf $3 \pm 0,1 \text{ mg g}^{-1}$ an und im weiteren Versuchszeitraum nahm dieser auf durchschnittlich $2,2 \pm 0,6 \text{ mg g}^{-1}$ ab. Die Konzentration an neutralen Polysacchariden lag zu Beginn des Versuchs bei $1,7 \pm 0,1 \text{ mg g}^{-1}$ und sank auf $0,9 \pm 0,1 \text{ mg g}^{-1}$ am dritten Tag. Anschließend blieb der neutrale Polysaccharidgehalt bei einem durchschnittlichen Wert von $1,1 \pm 0,3 \text{ mg g}^{-1}$.

Die Lipidkonzentration in der EPS der ALBA-Flocken war vergleichend zu den anderen drei Biopolymeren am höchsten vertreten. Die Änderung der Lipidmenge war durch eine Abnahme zu Beginn bis zum vierten Tag des Versuchs gekennzeichnet, von 31 ± 5 auf $4,5 \pm 1 \text{ mg g}^{-1}$. Danach nahm die Lipidmenge wieder zu, und lag durchschnittlich bei $16,6 \pm 5,6$ bis zum zehnten Tag. Der höchste Lipidgehalt von $51 \pm 5 \text{ mg g}^{-1}$ wurde am 12 Tag gemessen. Am darauf folgenden Tag sank dieser auf $6 \pm 5 \text{ mg g}^{-1}$.

Durch den Einsatz der Mikroalgen fand keine manuelle Belüftung der ALBA-Biomasse statt. Um die Sauerstoffversorgung der ALBA-Biomasse zu gewährleisten, erfolgte die Bestimmung der Sauerstoffkonzentration im ALBA-System durchgehend mittels einer nicht invasiven Optodentechnik (Abb. 11).

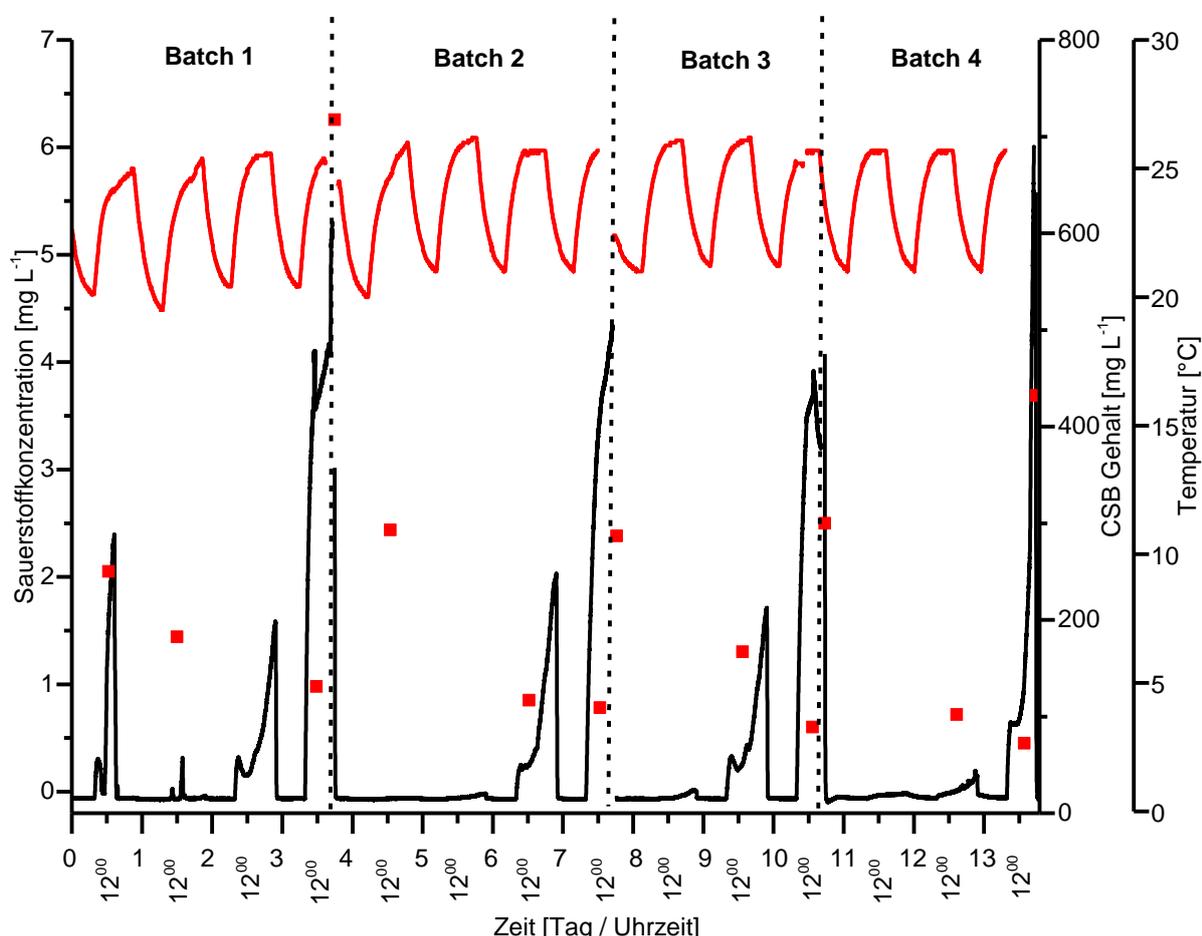


Abb. 11: Verlauf der Sauerstoffkonzentration in mg L⁻¹ (—) im Medium des Repeated-Fed-Batch Verfahrens mit Mikroalgen-Bakterien-Flocken über einen Versuchszeitraum von 13 Tagen. Zusätzlich wurde die Temperatur in °C (—) im Bioreaktor überwacht. Der CSB-Gehalt in mg L⁻¹ des Abwassers wird mit roten Quadraten (■) dargestellt. Bei einem CSB-Wert von ca. 100 mg L⁻¹ O₂ wurde das Abwasser erneuert und in Batch Bereiche 1, 2, 3 und 4 eingeteilt. Die gestrichelten, senkrecht zur Zeitachse verlaufenden Linien geben den Zeitpunkt der Zuführung an. Die Temperatur und Sauerstoffmessungen wurden alle 30 Sek aufgenommen. Der CSB-Gehalt entspricht einer einfachen Messung. Es wurde ein Tag-Nacht-Rhythmus von 14:10 Stunden eingestellt, dabei war die Lichtphase von 8-22 Uhr mit einer Lichtintensität von 200 μmol Photonen m⁻²s⁻¹.

Die Sauerstoffkonzentration im 2 L-Bioreaktor während des Versuchszeitraums ist in Abb. 11 abgebildet. Die Bestimmung der Sauerstoffkonzentration erfolgte mittels optischer Anregung eines Sensormembrans in 30 Sekunden Abständen und ergab ein wiederkehrendes Verlaufsmuster in allen vier Batch-Versuchen. Nach der Erneuerung des Abwassers, wurde in den darauf folgenden beiden Tagen kein Sauerstoff in der Lösung detektiert. Am dritten

Tag stieg die Sauerstoffkonzentration mit dem Lichtbeginn auf ca. $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ an. Im Reaktor wurde am vierten Tag einen Wert von ca. 4 mg L^{-1} Sauerstoff gemessen. Die durchgehenden Messungen der Temperatur innerhalb des Reaktors ergaben einen Temperaturanstieg von 20°C bis 25°C mit dem Lichtbeginn (Lichtphase von 8 - 22 Uhr). Sobald die Nachtphase begann, sank die Temperatur wieder auf 20°C . Da alle anderen Bedingungen bis auf Lichteinstrahlung gleich blieben, kann die Temperaturerhöhung durch die Lichtbestrahlung hervorgerufen sein.

Am Ende des Repeated-Fed-Batch Versuchs, wurde eine Probenmenge von 50 mL aus dem Reaktor entnommen und in ein Becherglas überführt. Mit einem Nadel-Sauerstoff-Mikrosensor wurden die Unterschiede der Sauerstoffkonzentration im Dunkeln und belichteten Zustand innerhalb der ALBA-Flocken und im Medium, nachfolgend Überstand genannt, gemessen.

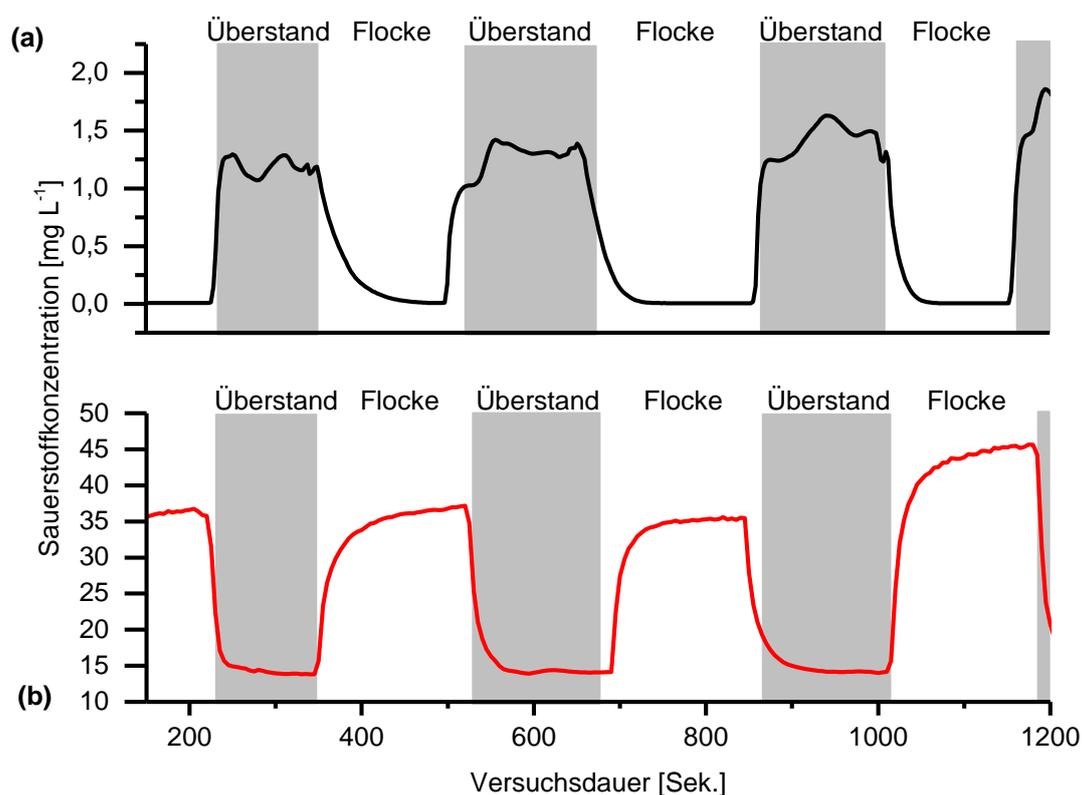


Abb. 12: Messung der Sauerstoffkonzentration im Überstand und in den Algen-Bakterien-Flocken im [a] dunklen (—) und [b] belichtet (—) mit $1050 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Das Messintervall betrug 5 Sek. Die grauen Bereiche zeigen die Messungen im Überstand und die weißen markierten Bereiche die in den Flocken.

Der CSB-Gehalt der untersuchten Probe lag bei einem Wert von $93,5 \pm 19,4 \text{ mg L}^{-1}$ und die Trockensubstanz bei einem Wert von $2,45 \text{ g L}^{-1}$. Nach einer 10-minütigen Dunkeladaption der Algen-Bakterien-Probe wurden die Messungen im Dunkeln durchgeführt (siehe Abb.

12a). Durch Wechsel aus der Flocke in den Überstand stieg die Sauerstoffkonzentration sprunghaft von Null auf ca. $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ an. Beim Eindringen in die Flocke sank die Sauerstoffkonzentration wieder auf null. Der belichtete Ansatz wurde nach einer 10-minütigen Beleuchtung der Probe mit $1050 \text{ } \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ durchgeführt (Abb. 12b). Die Messungen ergaben eine konstante Sauerstoffkonzentration von 13 mg L^{-1} im Überstand. Beim Eindringen in die ALBA-Flocke stieg die Konzentration schlagartig auf $35 - 45 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_2$ an. Unter Normalbedingungen (STP „Standard Temperature and Pressure“) beträgt die Sauerstoffsättigung des Wassers 8 mg L^{-1} . Dies entspricht einer 5-fachen O_2 -Übersättigung.

4.1.2 Abwasserreinigung im Pilotmaßstab

Nachdem das Verfahren im Labormaßstab erfolgreich getestet wurde, galt es nun in einem zweiten Schritt, die erhaltenen Ergebnisse auf den Pilotmaßstab zu übertragen. Die PTS konstruierte hierfür eine 800 L und 1600 L Anlage um das Papierfabrikabwasser mit Mikroalgen und Bakterien zu reinigen. Während der Laufzeit beider Anlagen wurden diverse Parameter, wie die Bestimmung von Nährstoffen, CSB-Abbaugrad, mikroskopische Aufnahmen u.v.m. überwacht (Daten nicht veröffentlicht). Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Charakterisierung von ALBA-Flocken. Hierfür wurden Untersuchungen zur Bildung stabiler ALBA-Flocken durchgeführt. Die Bestimmung der Chlorophyllkonzentration in der ALBA-Biomasse und im Nachklärbecken, stellte den Indikator der Vergesellschaftung beider Komponenten zur ALBA-Flocken dar. Ein niedriger Chlorophyllwert im Nachklärbecken schließt auf eine erfolgreiche Inkorporation der freien Mikroalgen in den Belebtschlamm. Weiterhin sollte die Analyse des Protein-, Polysaccharid- und Lipidgehaltes in der EPS der ALBA-Flocken Rückschlüsse zur Flockenstabilität geben.

Zur Klärung der Frage, ob sich ein stabiles Konsortium aus Bakterien und Eukaryoten im Laufe der Zeit bildet, wurde mittels DGGE- Analyse die Zusammensetzung der prokaryotischen und eukaryotischen Populationen untersucht. Die MiSeq/Illumina 16S-rRNA Sequenzierung ermöglichte eine taxonomische Klassifizierung und quantitative Auswertung im 800 L-Reaktor in der 2., 8. und 15. Woche.

Die dargestellten Ergebnisse der Pilotanlagen beziehen sich auf den Zeitraum Ende Juni bis Anfang Oktober 2014.

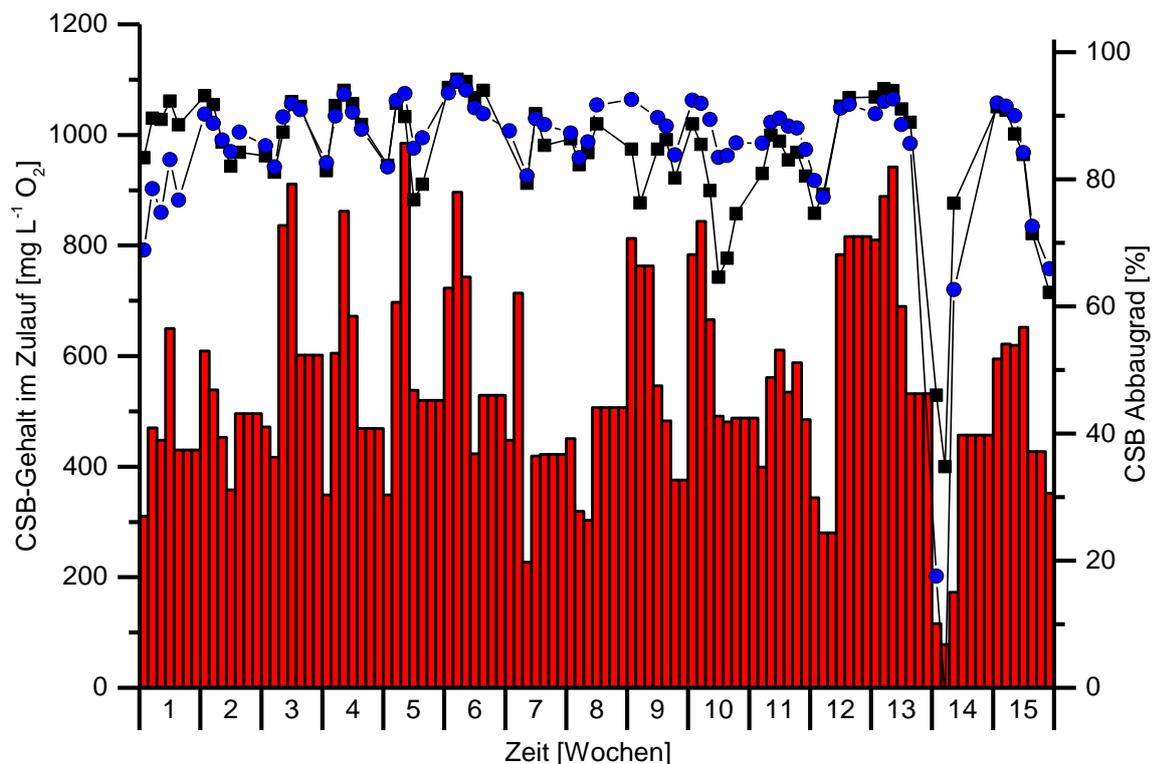


Abb. 13: Übersicht des CSB-Gehaltes im Zulauf (■) beider Pilotanlagen. Jeder Balken steht für einen Tag in der Woche. Die Probeentnahmen wurden alle 24 Stunden durchgeführt. Dargestellt ist der CSB-Abbaugrad des 800 L (—■—) und des 1600 L (—●—) Reaktors. Der CSB-Abbaugrad wurde aus dem CSB-Gehalt der Nachklärung bezogen auf den CSB-Gehalt im Zulauf berechnet. Die CSB-Konzentration im Nachklärbecken wurde nur am Wochenende nicht gemessen. Die Daten entsprechen einfach Messungen. Die dargestellten Ergebnisse beziehen sich auf den Zeitraum Ende Juni bis Anfang Oktober 2014¹.

In Abb. 13 sind die CSB-Werte im Zulauf und die CBS-Abbaueffizienz im 800 L und 1600 L Reaktor über einen Versuchszeitraum von 15 Wochen täglich dargestellt. Der CSB-Gehalt des zu reinigenden Abwassers lag zwischen 200 bis 900 mg L⁻¹. In der 14. Woche lagen die CBS-Werte im Zulauf unter 100 mg L⁻¹, in diesen Tagen wurde ebenfalls eine niedrige Abbaueffizienz gemessen. Die durchschnittliche Abbaueffizienz des kleineren Reaktors lag bei 84,52±10% und die des großen Reaktors bei 84,6±14,6%.

Die wöchentliche Konzentrationsbestimmung der Proteine, Polysaccharide und Lipide in der EPS der ALBA-Flocken beider Anlagen wurden als Parameter für die Flockenstabilität herangezogen.

¹ Die Datenerhebung erfolgte von der PTS.

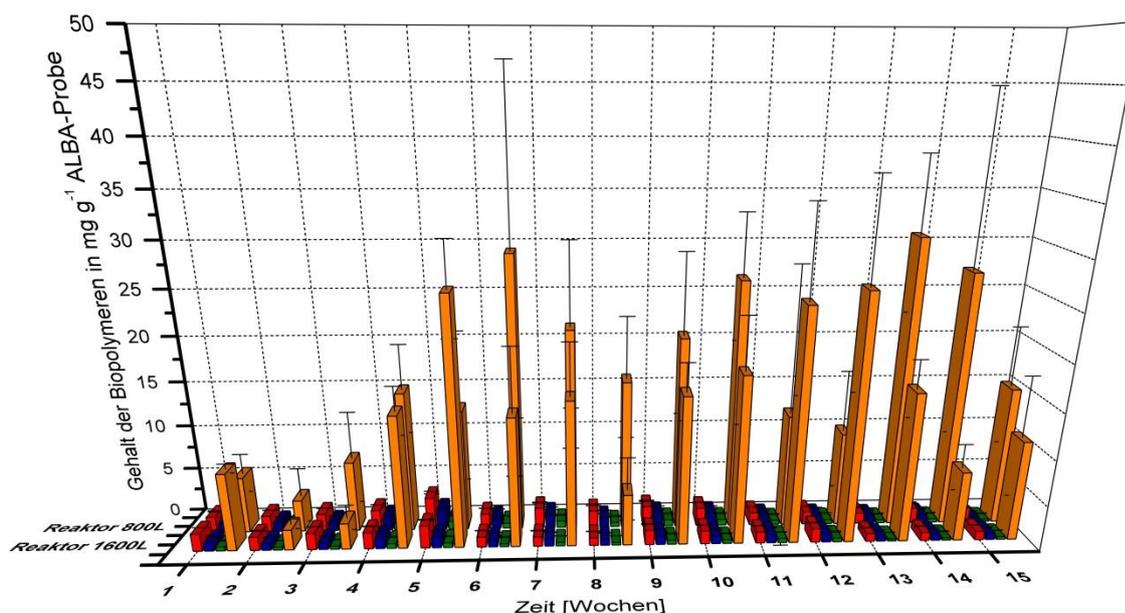


Abb. 14: Übersicht des Biopolymergehaltes (mg g^{-1} ALBA-Probe) der extrazellulären polymeren Substanzen aus der ALBA Abwasserreinigung beider Pilotanlage (800 L und 1600 L), in einem zeitlichen Verlauf von 15 Wochen. Die Proben wurden Anfang der Woche entnommen. Dargestellt ist die Veränderung des Protein- (■), sauren Polysaccharid- (■), neutralen Polysaccharid- (■) und Lipidgehaltes (■). Mittelwert \pm Standardabweichung ($n=3$).

Eine Übersicht der Mengen an Proteinen, Polysacchariden und Lipiden in der EPS der ALBA-Proben des 800 L und 1600 L Reaktors innerhalb der 15 Versuchszeitwochen ist in Abb. 14 dargestellt. Grundsätzlich zeigten die Ergebnisse beider Reaktoren ein ähnliches Bild. Die Auswertungen ergaben einen hohen Lipidgehalt, gleiche Menge an Proteinen und sauren Polysacchariden. Neutrale Polysaccharide waren am geringsten vertreten. Die Proteine, saure und neutrale Polysaccharide erreichten während des gesamten Experiments keine Mengen über 5 mg g^{-1} ALBA-Probe. Im 800 L-Reaktor lag die Proteinmenge durchschnittlich bei einem Wert von $1,93 \pm 0,57 \text{ mg g}^{-1}$, im 1600 L-Reaktor bei einem Wert von $1,42 \pm 0,47 \text{ mg g}^{-1}$. Im kleinerem Reaktor war der Gehalt der sauren Polysaccharide durchschnittlich bei $1,17 \pm 0,40 \text{ mg g}^{-1}$ und der neutralen Polysaccharide bei $0,54 \pm 0,17 \text{ mg g}^{-1}$. Der 1600 L-Reaktor erreichte etwas niedrigere Polysaccharid-Werte, die sauren durchschnittlich $0,83 \pm 0,18 \text{ mg g}^{-1}$ und die neutralen $0,38 \pm 0,09 \text{ mg g}^{-1}$. Sowohl der kleine als auch der große Reaktor verzeichnete in der 5. Woche die höchsten Werte an Proteinen, sauren und neutralen Polysacchariden. Lipide waren in der EPS der ALBA-Proben in beiden Reaktoren am höchsten vertreten. Durchschnittlich lag die Lipidkonzentration bei $17,19 \pm 8,56 \text{ mg g}^{-1}$ im 800 L-Reaktor und $14,14 \pm 7,84 \text{ mg g}^{-1}$ im 1600 L-Reaktor. Eine hohe Standardabweichung ist bei den Lipiden zu vermerken. Insgesamt erreichte die größere Anlage niedrigere Werte in allen vier untersuchten Biopolymeren, als die kleinere Anlage.

Die Bestimmung des Chlorophyllgehaltes in der ALBA-Biomasse und im gereinigten Abwasser (Nachklärbecken), wurde als ein weiterer Parameter herangezogen, um den Inkorporationstand von Algen und Bakterien als Flocke zu beschreiben.

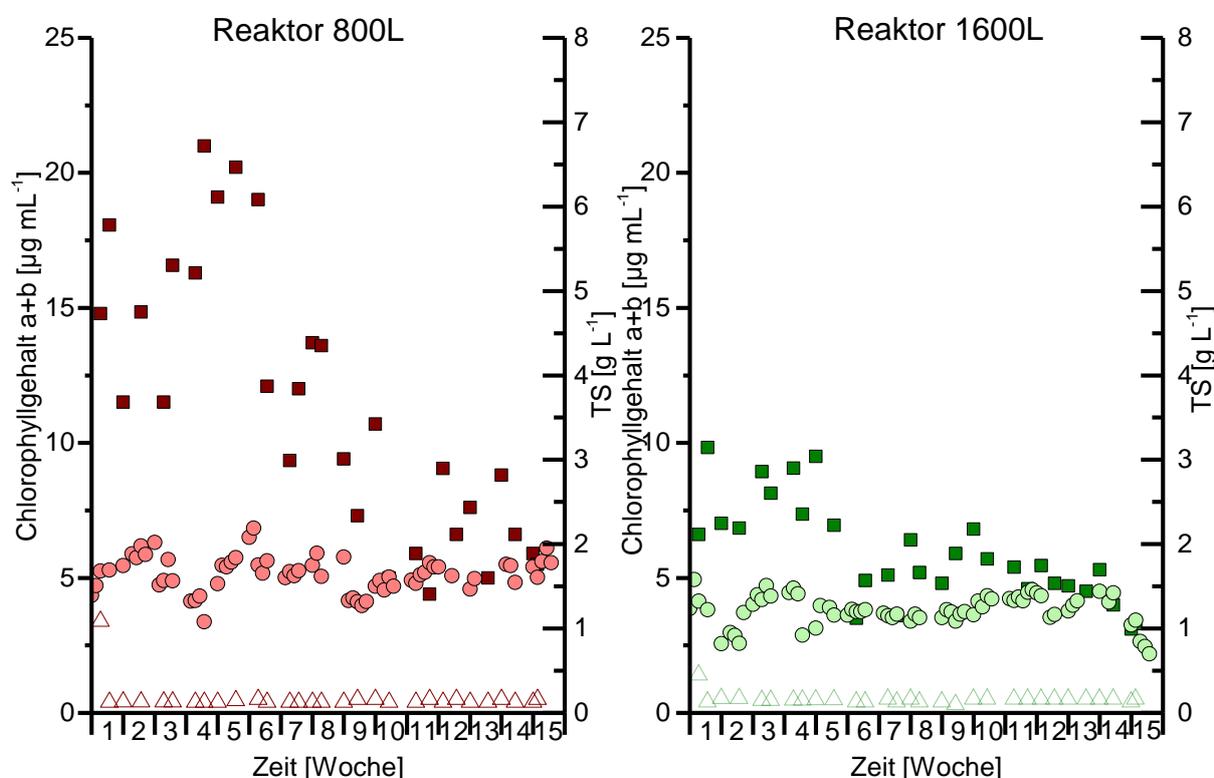


Abb. 15: Übersicht des Pigmentgehaltes ($\mu\text{g mL}^{-1}$) der ALBA-Biomasse und im Nachklärbecken beider Reaktoren im Versuchszeitraum von 15 Wochen. Die Extraktion erfolgte nach (Barnes et al., 1992). Dargestellt ist: links = Reaktor 800 L mit Chlorophyllgehalt in der ALBA-Biomasse (\blacksquare), im Nachklärbecken (\triangle) und die Trockensubstanz (\circ); rechts = Reaktor 1600 L mit Chlorophyllgehalt in der ALBA-Biomasse (\blacksquare), im Nachklärbecken (\triangle) und die Trockensubstanz (\circ). Die Chlorophyllproben wurden Mittwoch und Freitag entnommen. Die TS-Proben wurden vier Mal in der Woche gemessen. Die Daten entsprechen einer Einfach-Messung².

Die Chlorophyllkonzentration in der Biomasse und im Nachklärbecken ist in Abb. 15 dargestellt. Zu Beginn des Experiments ist die Abnahme des Algenanteils im Nachklärbecken und gleichzeitig die Zunahme in der ALBA-Biomasse in beiden Reaktoren erkennbar. Somit erfolgte eine Vergesellschaftung der freien Mikroalgen mit den Bakterien (Belebtschlamm). Im weiteren Verlauf bleibt der Chlorophyllgehalt im Nachklärbecken weitestgehend stabil, durchschnittlich bei $0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$. Der Chlorophyllgehalt in der Biomasse nimmt im Laufe der 15 Wochen in beiden Reaktoren stetig ab. Die höchsten Chlorophyllwerte sind in den ersten 6 Wochen zu verzeichnen. Vergleichend zum großen

² Die Datenerhebung erfolgte von der PTS.

Reaktor ist im kleineren Reaktor doppelt so viel Chlorophyll gemessen worden. Die TS-Bestimmung ergab im 800 L-Reaktor in den ersten zwei Wochen eine stetige Zunahme auf ca. 2 g L^{-1} . Eine Abnahme auf ca. 1 g L^{-1} ist in den anschließenden zwei Wochen zu detektieren. Im weiteren Verlauf erhöhte sich die Biomasse und blieb zwischen $1,5$ bis 2 g L^{-1} . Im großen Reaktor nahm die Biomasse in den ersten zwei Wochen ebenfalls ab, von $1,4$ auf $0,8 \text{ g L}^{-1}$. Eine Zunahme auf ca. $1,5 \text{ g L}^{-1}$ ist in der dritten und vierten Woche bestimmt worden. In den darauf folgenden Wochen blieb der TS-Gehalt stabil bei einem Wert von ca. $1,3 \text{ g L}^{-1}$. Zum Ende des Versuchs (ab 14. Woche) ist eine Reduzierung der TS-Konzentration auf ca. $0,7 \text{ g L}^{-1}$ erfasst worden.

Phylogenetische Analyse der ALBA-Biomasse

Die Diversitätsdynamik innerhalb der bakteriellen und der eukaryotischen Domäne wurde in beiden Pilotanlagen (800 L und 1600 L) mittels DGGE-Analyse untersucht. Fünfzehn Wochen lang wurden wöchentlich Proben aus beiden Anlagen entnommen (1-15). Anschließend wurde die genomische DNA extrahiert und mit spezifischen Primern 16S-rRNA-Amplifikons für Bakterien (GM5for* und GM907r) und 18S-rRNA-Amplifikons für Eukaryoten (1427–1453f* und 1616–1637r) mittels PCR-Verfahren hergestellt. Anschließend wurden die PCR Produkte aufgrund ihrer unterschiedlichen GC- Gehalte im DGGE Gel aufgetrennt. Ein charakteristisches Bandenmuster für die jeweilige Woche entsteht. Um die Spezies der dahinterliegenden Bande zu identifizieren wurden repräsentative Banden aus dem Gel ausgeschnitten und sequenziert. Die Sequenzen wurden mittels der NCBI Datenbank verglichen und den nächsten verwandten Organismen zugeordnet. Dabei wurden Sequenzen bislang nicht kultivierter oder klassifizierter Mikroorganismen nicht berücksichtigt.

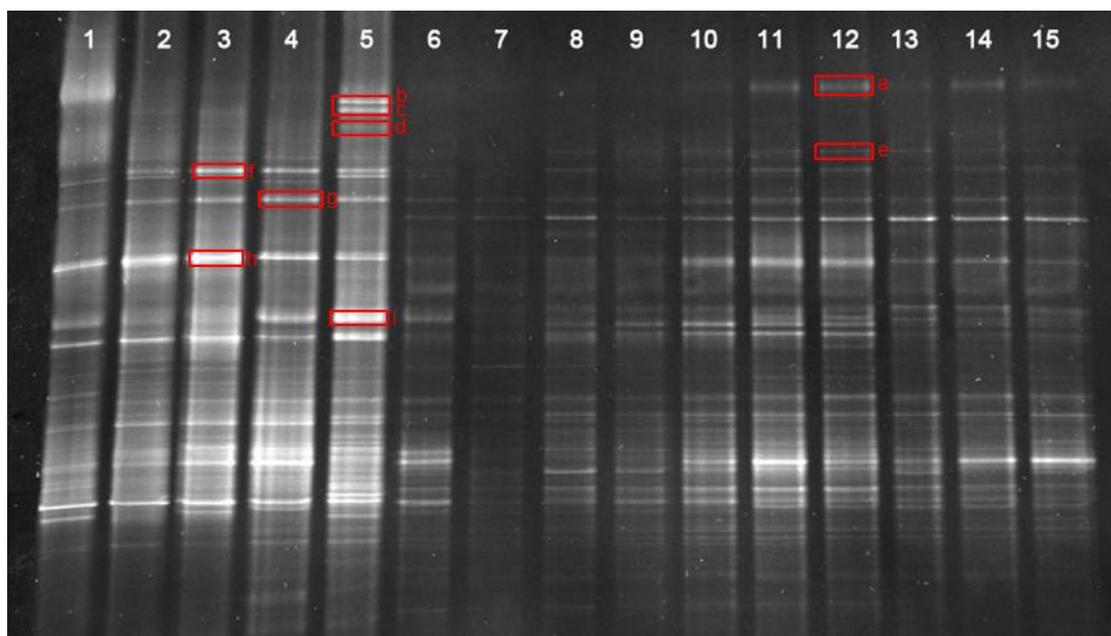


Abb. 16: DGGE-Profil des 800 L-Reaktors. Amplifizierte 16S-rRNA-Genfragmente der isolierten DNA Probe mit GM5f* und GM907rM Primern. 6%-iges Harnstoff-Formamid Gel. Die Spuren 1-15 repräsentieren die unterschiedlichen Wochen (1-15) der Probennahme in 7-tägigen Abständen. Die verschiedenen DGGE-Banden repräsentieren die 16S-rRNA-Genfragmente der assoziierten Mikroorganismen. Rot umrandete Banden a-i wurden sequenziert (siehe Vorgang in 3.6.). (a) *Flavobacterium lutivivi* (b) Plastid: *Nitzschia frustulum*, (c) Chloroplast: *Virgulinema fragilis*, (d) *Ideonella* sp. (e) *Phaeodactylibacter luteus*, (f) *Flavobacterium* sp., (g) *Flavobacterium maotaiense* (h) *Flavobacterium* sp., (i) Chloroplast: *Chlorella* sp.

Das DGGE-Profil (Abb. 16) zeigte die bakterielle Zusammensetzung der 800 L Pilotanlage an unterschiedlichen Wochen (1-15). Insgesamt war eine hohe Biodiversität zu erkennen. Bereits in den ersten vier Wochen repräsentierte das Bandenmuster eine relativ stabile

phylogenetische Struktur. Hierbei fielen sieben DNA-Fragmente durch ihre intensive Stärke auf. In der fünften Woche erhöhte sich die Bandenanzahl kurzfristig. Die sechste und siebte Woche zeichnete sich durch einen Einbruch der Bandenanzahl aus. Die Zusammensetzung der Bakterienarten formierte sich ab der achten Woche neu. Alte intensive Banden wurden durch neue Banden ersetzt. Die Bande a schimmerte immer wieder leicht durch, kam aber erst ab der 10. Versuchswoche intensiv in Erscheinung. Während nach der 5. Woche die Bande b, c und d nicht mehr nachgewiesen wurden, tauchte Bande e auf.

Im gesamten Versuchszeitraum wurden Bande f und g zu jeder Messwoche detektiert. Die Bande h und i verloren zwar in der 7. und 8. Woche deutlich an Intensität, konnten aber dennoch nachgewiesen werden. Insgesamt ist ab der achten Woche ein relativ stabiles Bandenmuster erkennbar.

Die rot umrandeten Banden mit der Beschriftung a-i wurden extrahiert und sequenziert. In der Tab. 11 werden die Sequenzergebnisse, durch die Verwendung des BLAST-Algorithmus der Online-Datenbank NCBI mit Sequenzen bekannter Isolate verglichen.

Tab. 11: Phylogenetische Zuordnung der sequenzierten DGGE-Banden der amplifizierten 16S-rRNA-Genfragmente aus dem 800 L-Reaktor. Sowie die Übersicht der nächsten Verwandten mit prozentualen Übereinstimmungen.

DGGE Bande	Phylogenetische Gruppe	Phylogenetische Zuordnung (Accession)	Sequenz-identität [%]
a	Bacteroidetes	<i>Flavobacterium lutivivi</i> (KT215492.1)	99%
d	Proteobacteria	<i>Ideonella sp.</i> (AB769197.1)	90%
e	Bacteroidetes	<i>Phaeodactylibacter luteus</i> (NR_136808.1)	76%
f	Bacteroidetes	<i>Flavobacterium sp.</i> (AM922192.1)	99%
g	Bacteroidetes	<i>Flavobacterium maotaiense</i> (KF857166.1)	94%
h	Bacteroidetes	<i>Flavobacterium sp.</i> (KX022920.1)	76%
b	Plastid	<i>Nitzschia frustulum</i> (AY221721.1)	99%
c	Chloroplast	<i>Virgulinema fragilis</i> (JN207220.1)	94%
i	Chloroplast	<i>Chlorella sp.</i> (KF554427.1)	99%

Die sequenzierte Bande a wurde mit der Länge von 521 bp mit einer Übereinstimmung von 99 % *Flavobacterium lutivivi* zugeordnet. Das Proteobacterium *Ideonella sp.* konnte mit einer 90%-igen Ähnlichkeit der Bande d zugewiesen werden. Bei dem Bacteroides Vertreter *Phaeodactylibacter luteus*, besaß die sequenzierte Bande e eine Länge von 490 bp und stimmte mit nur 76%-igen Identität überein. Die Banden f, g und h konnten in die Klasse der Flavobacteriia eingruppiert werden. Dabei ähnelte die sequenzierte Bande f *Flavobacterium sp.* (99%), die Bande g *Flavobacterium maotaiense* (94%) und die Bande h *Flavobacterium sp.* (76%). Darüber hinaus handelte es sich bei den Banden b, c und i um eukaryotische

Plastide und Chloroplasten. *Nitzschia frustulum* konnte mit einer Übereinstimmung von 99% der Bande b zu zugeordnet werden. Die sequenzierten Banden c und i wiesen mit einer Identität von 94% und 99% eine hohe Ähnlichkeit zu *Virgulinema fragilis* und *Chlorella sp.* auf.

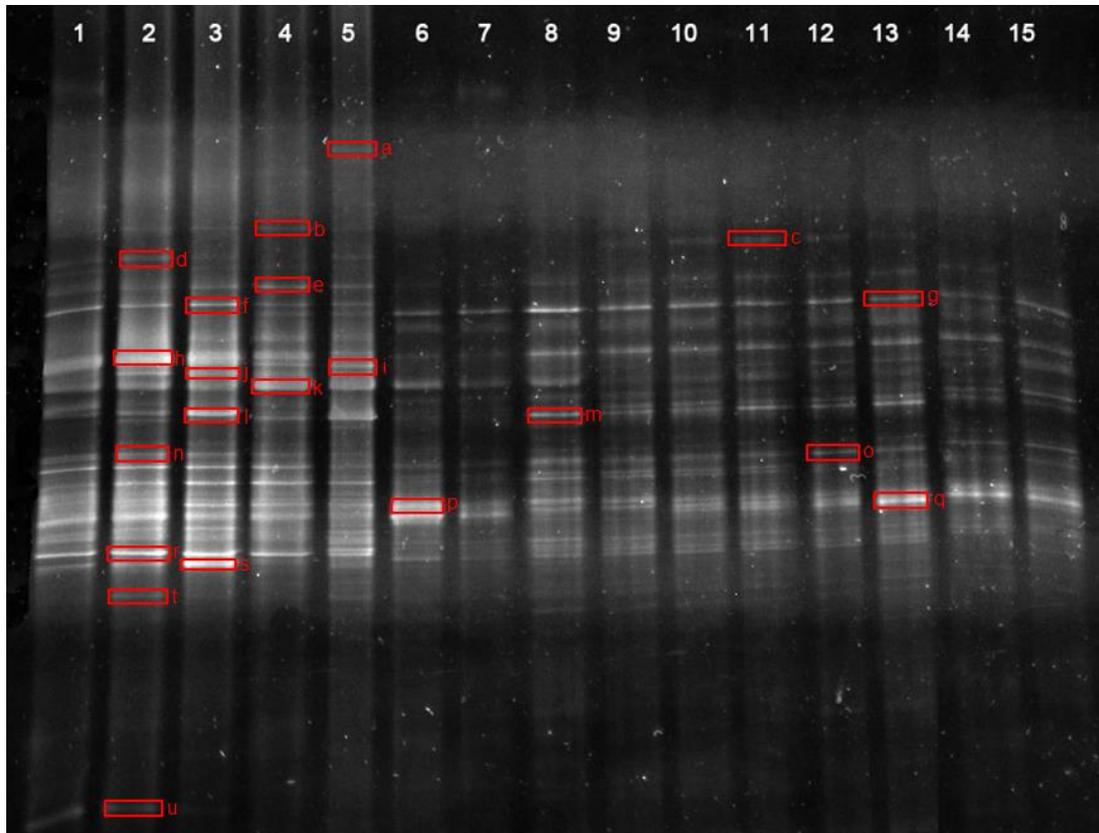


Abb. 17: DGGE-Profil des 1600 L-Reaktors. Amplifizierte 16S-rRNA-Genfragmente der isolierten DNA Probe mit GM5f* und GM907rM Primern. 6%-iges Harnstoff-Formamid Gel. Die Spuren 1-15 repräsentieren die unterschiedlichen Wochen (1-15) der Probennahme in 7-tägigen Abständen. Die verschiedenen DGGE-Banden repräsentieren die 16S-rRNA-Genfragmente der assoziierten Mikroorganismen. Banden a-u wurden sequenziert (siehe Vorgang in 3.6.). (a) Plastid: *Nitzschia frustulum*, (b) *Flavobacterium filum*, (c) *Flavobacterium sp.*, (d) *Hydrogenophaga sp.*, (e) *Terrimonas sp.*, (f) unkultivierbares Sphingobacteriales, (g) unkultivierbares Chlorobi Bakterium, (h) unkultivierbares Saprospiraceae Bakterium, (i) Chloroplast: *Chlorella sp.*, (j) Flavobacteriaceae Bakterium, (k) Chloroplast: *Chlorella sp.*, (l) *Desulfopila sp.*, (m) Sphingobacteriales Bakterium, (n) *Calothrix sp.*, (o) *Novosphingobium resinovorum*, (p & q) *Thiothrix eikelboomii*, (r) *Ideonella sp.*, (s) *Ruminobacter sp.*, (t) *Hydrogenophaga sp.*, (u) Rhizobiales Bakterium.

Betrachtet man das DGGE-Profil des Reaktors 1600 L (Abb. 17) und die bakterielle Veränderung innerhalb der 15 Wochen, ist eine Reduzierung der Bandenmenge im zeitlichen Verlauf zu erkennen. Wie bereits im 800 L-Reaktor (Abb. 16) war auch hier eine hohe Diversität zu erkennen. Das Bandenmuster war in den ersten fünf Wochen stabil. Davon stachen 8 Banden (f, h, k, l, n, o, p und r) durch ihre starke Intensität hervor. In der sechsten Woche verringerte sich die Bandenanzahl und blieb bis zum Versuchsende relativ konstant.

Hierbei veränderte sich das Bandenmuster leicht im Vergleich zu den ersten fünf Wochen. Sechs Banden rückten durch ihre Intensität in den Vordergrund (g, h, k, m, o und q). Nach der 5. Woche wurden die schwachen Banden b, d nicht mehr detektiert. Die intensiven Banden f und r tauchten ebenfalls nicht mehr auf. Stattdessen wurde Bande g erst schwach und bis zum Versuchsende immer intensiver erkennbar. Zwar verloren die Banden e, h, k, l, m und o in der 6. und 7. Woche an Intensität, konnten aber durchgehend nachgewiesen werden. Bei der Betrachtung der Banden p und q ist eine Doppelbande zu erkennen, weshalb diese im DGGE-Profil verschwommen wirkte. Die Ergebnisse der 16S-rRNA-Analyse für beide Banden zeigten eine 100%-ige genetische Übereinstimmung mit der Gattung *Thiothrix* und der dazugehörigen Spezies *Thiothrix eikelboomii*. Inkonsequent traten die mit a, c, s, t, und u bezeichneten Banden zwischendurch in Erscheinung und verschwanden wieder.

Die Sequenzanalyse der extrahierten 16S-rRNA-Genfragmente aus dem DGGE-Gel (rot umrandeten Banden mit der Beschriftung a-u) ist in der Tab. 12 aufgelistet.

Tab. 12: Phylogenetische Zuordnung der sequenzierten DGGE-Banden der amplifizierten 16S-rRNA-Genfragmente aus dem 1600 L-Reaktor und die prozentuale Sequenzidentität zum nächsten Verwandten.

DGGE Bande	Phylogenetische Gruppe	Phylogenetische Zuordnung (Accession)	Sequenz- identität [%]
b	Bacteroidetes	<i>Flavobacterium filum</i> (NR_043767.1)	98%
c	Bacteroidetes	<i>Flavobacterium sp.</i> (AM922192.1)	99%
d	Betaproteobacteria	<i>Hydrogenophaga sp.</i> (HM194607.1)	86%
e	Bacteroidetes	<i>Terrimonas sp.</i> (LN833352.1)	92%
f	Bacteroidetes	<i>Solitalea canadensis</i> (KF528160.1)	97%
g	Chlorobi	Chlorobi Bakterium (CU925749.1)	100%
h	Bacteroidetes	Saprospiraceae Bakterium (EF523442.1)	100%
j	Bacteroidetes	<i>Flavobacteriaceae</i> Bakterium (AM403225.1)	82%
l	Deltaproteobacteria	<i>Desulfopila sp.</i> (HG932656.1)	84%
m	Bacteroidetes	<i>Sphingobacteriales</i> Bakterium (JQ825274.1)	76%
n	Cyanobacteria	<i>Calothrix sp.</i> (JN705664.1)	91%
o	Alphaproteobacteria	<i>Novosphingobium resinovorum</i> (KU991485.1)	87%
p & q	Gammaproteobacteria	<i>Thiothrix eikelboomii</i> (AB042541.1)	100%
r	Betaproteobacteria	<i>Ideonella sp.</i> (KC248055.1)	99%
s	Gammaproteobacteria	<i>Ruminobacter sp.</i> (AB730720.1)	73%
t	Betaproteobacteria	<i>Hydrogenophaga sp.</i> (DQ413154.1)	97%
u	Alphaproteobacteria	Rhizobiales Bakterium (KM083137.1)	98%
a	Plastid	<i>Nitzschia frustulum</i> (AY221721.1)	97%
k	Chloroplast	<i>Chlorella sp.</i> (KF554427.1)	99%

Die phylogenetische Einordnung der Banden b, c, e, f, h, j und m wurde dem Phylum Bacteroidetes zugeordnet. Dabei konnten die Spezies *Flavobacterium filum* (b, 98%), *Flavobacterium sp.* (c, 99%), *Terrimonas sp.* (e, 92%) und *Solitalea canadensis* (f, 97%) identifiziert werden. Außerdem konnte die DNA der Bande h, j und m lediglich bis zur Familienebene zugeordnet werden. Dabei waren die Familien Saprospiraceae (h, 100%), Flavobacteriaceae (j, 82%) und Sphingobacteriales (m, 76%) vertreten. Die DGGE-Banden o und u repräsentierten Alphaproteobacteria. Das Sub-Phylum der Betaproteobacteria wurde in Bande d, r und t nachgewiesen. Die Sequenzergebnisse zeigten Übereinstimmungen mit den Spezies *Hydrogenophaga sp.* (d, 86%) *Ideonella sp.* (r, 99%) und *Hydrogenophaga sp.* (t, 97%). Außerdem konnte Bande p, q und s dem Sub-Phylum Gammaproteobacteria zugeordnet werden. Die Vertreterspezies waren *Thiothrix eikelboomii* (p & q, 100%) und *Ruminobacter sp.* (s, 73%). Das Sub-Phylum Deltaproteobacteria war mit *Desulfopila sp.* (l, 84%) vertreten. Die sequenzierte Bande g wurde mit einer 100% Identität einem Chlorobi Bakterium zugewiesen. Die DGGE-Bande n wurde mit einer Sequenzübereinstimmung von 91% dem Cyanobakterium *Calothrix sp* identifiziert. Darüber hinaus wurden eukaryotische Plastide und Chloroplasten mit den Spezies *Nitzschia frustulum* (97%) und *Chlorella sp.* (99%) der Banden a und k zugeordnet.

Die eukaryotische Diversitätsveränderung im 800 L (Abb. 18) und 1600L (Abb. 19) Freilandreaktor wurde mittels der DGGE-Analyse untersucht. Dafür wurden 18S-rRNA-Amplikons mit spezifischen Primern (1427–1453f* und 1616–1637r) hergestellt und auf das 8%-ige Harnstoff-Formamid Gel aufgetragen.

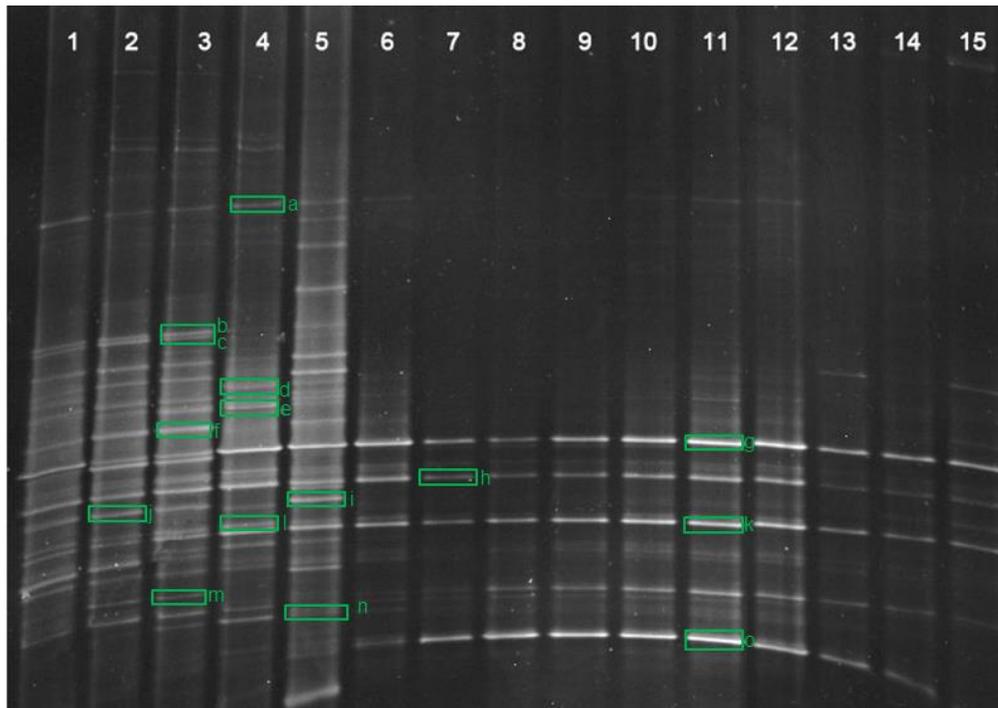


Abb. 18: DGGE-Profil des 800 L-Reaktors. Amplifizierte 18S-rRNA-Genfragmente der isolierten DNA Probe mit 1427–1453f* und 1616–1637r Primern. 8%-iges Harnstoff-Formamid Gel. Die Spuren 1-15 repräsentieren die unterschiedlichen Wochen (1-15) der Probennahme in 7-tägigen Abständen. Die verschiedenen DGGE-Banden repräsentieren die 18S-rRNA-Genfragmente der assoziierten Mikroorganismen. Grün umrandete Banden (a-o) wurden sequenziert (siehe Vorgang in 3.6.). (a) *Microsporidium* sp., (b & c) *Dexiotricha* sp., (d) *Sphaeroeca leprechaunica*, (e) *Euplotes aediculatus*, (f) unkultivierbarer Ciliata, (g) *Chlorella* sp., (h) *Neocystis mucosa*, (i & j) *Gomphonema* sp., (k) *Spermatozopsis similis*, (l) *Tetrademus dimorphus*, (m) *Chlamydomonas desmidii*, (n) unkultivierbarer Fungi., (o) unkultivierbarer Cryptomycota.

Das DGGE-Profil (Abb. 18) zeigte die Eukaryotendiversität im 800 L Pilotreaktor im zeitlichen Verlauf von 15 Wochen. Erwähnenswert ist die Veränderung der hohen Diversität in den ersten fünf Wochen, mit mehr als 20 Banden und anschließender Abnahme auf ca. 7 Banden. Ebenfalls nimmt die Chlorophyllmenge in diesen Wochen ab (siehe Abb. 15). Die DGGE-Untersuchung wies drei Hauptbanden (g, h und k) durch ihre distinkte und starke Intensität durchgehend nach. Alle drei Banden konnten dem Phylum Chlorophyta zugeordnet werden. Dabei ergaben die Sequenzanalysen mittels der NCBI Datenbank mit einer Übereinstimmung mit 99% *Chlorella* sp. (8), mit 93% *Neocystis mucosa* (9) und mit einer 88% *Spermatozopsis similis* (12). Das Bandenmuster war in den ersten fünf Wochen durch eine hohe Bandenzahl geprägt. Auch der Chlorophyllgehalt lag in diesen Wochen höher, zwischen 11-21 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (siehe Abb. 15). Laut der Bandenzahl nahm die Diversität ab und die Bande a, b, c, d, e, f, i, j und n tauchten nachfolgend nicht mehr auf. Die Bande m konnte in der 4. bis 7. Woche nicht nachgewiesen werden. Dabei ergaben die Sequenzanalysen eine 99%-ige Ähnlichkeit zu *Chlamydomonas desmidii*. Ab der sechsten Woche war die

Bande o mit starker Intensität bis zum Versuchsende erkennbar. Diese Bande wies eine 99%-ige Übereinstimmung mit einem unkultivierbarem Cryptomycota auf. Nach der 5. Woche ist das DGGE-Bandenmuster durch wenige Banden gekennzeichnet und bleibt bis zum Versuchsende stabil. Repräsentativ sind die Banden g, h, k, m und o.

Die Sequenzanalyse der extrahierten 18S rRNA-Genfragmente aus dem DGGE-Gel des 800 L-Reaktors wird in der Tab. 13 aufgeführt. Die grün umrandeten Banden mit der Beschriftung a-o wurden ausgeschnitten, extrahiert und sequenziert.

Tab. 13: Analyse der nächsten Verwandten Arten im 800 L-Reaktor. 18S-rRNA-Genfragmente wurden für die phylogenetische Einordnung aus dem DGGE-Gel extrahiert.

DGGE Bande	Phylogenetische Gruppe	Phylogenetische Zuordnung (Accession)	Übereinstimmung [%]
a	Fungi	<i>Microsporidium</i> sp. (KR303710.1)	97
b/c	Alveolata	<i>Dexiotricha</i> sp. (JQ723963.1)	84/89
d	Choanoflagellida	<i>Sphaeroeca leprechaunica</i> (KJ631042.1)	89
e	Alveolata	<i>Euplotes aediculatus</i> (EU103618.1)	93
f	Alveolata	Uncultured Ciliate	87
g	Chlorophyta	<i>Chlorella</i> sp. (KF879601.1)	99
h	Chlorophyta	<i>Neocystis mucosa</i> (JQ920366.1)	93
i/j	Bacillariophyta	<i>Gomphonema</i> sp. (KJ961664.1)	99/99
k	Chlorophyta	<i>Spermatozopsis similis</i> (X65557.1)	88
l	Chlorophyta	<i>Tetrademus dimorphus</i> (LC192134.1)	99
m	Chlorophyta	<i>Chlamydomonas desmidii</i> (LC107107.1)	99
n	Fungi	Uncultured Fungus (KC672752.1)	88
o	Fungi	Uncultured Cryptomycota (KP096140.1)	99

Fünf Hauptbanden (g, h, k, m und o) fielen durch ihre distinkte, starke Intensität und durchgehende Präsenz auf dem DGGE-Gel (Abb. 18) auf. Die Sequenzanalyse der Bande g, h, k und m konnten dem Phylum Chlorophyta zugeordnet werden. Dabei ergaben die Sequenzergebnisse mittels der NCBI Datenbank mit einer Übereinstimmung mit 99% *Chlorella* sp. (g), mit 93% *Neocystis mucosa* (h) 88% *Spermatozopsis similis* (k) und mit einer 99% Übereinstimmung *Chlamydomonas desmidii* (m). Die Bande o ähnelte zu 99% einer bisher unkultivierbaren Cryptomycota Gruppe.

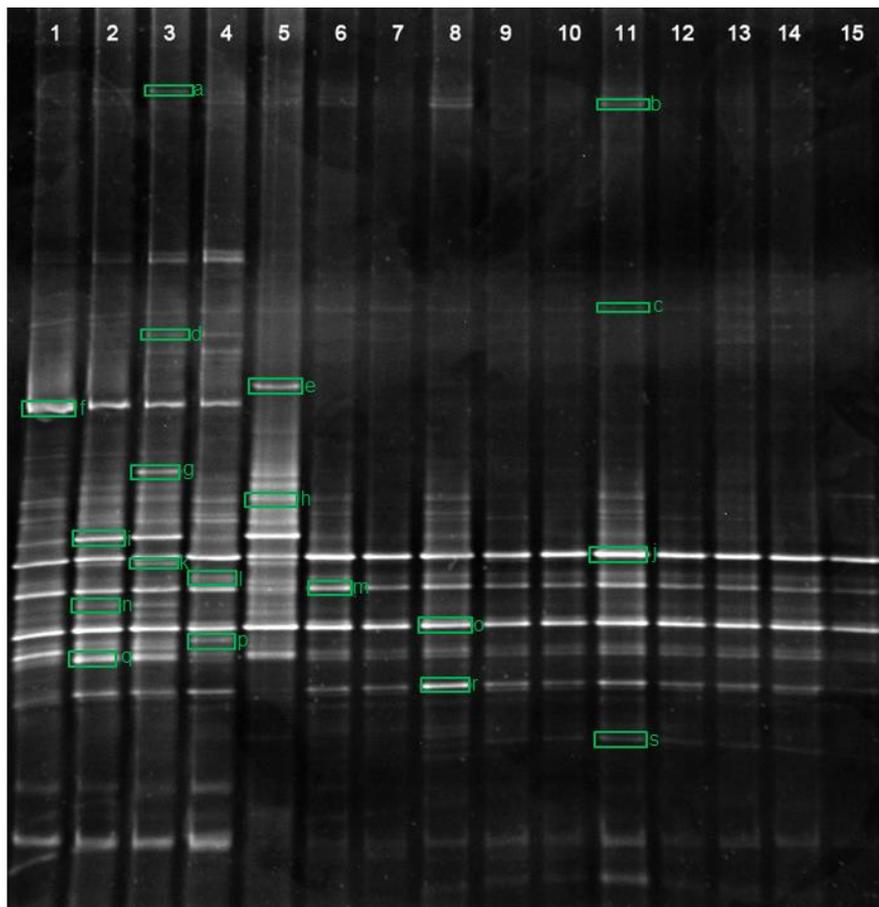


Abb. 19: Untersuchung der Populationsdynamik mittels DGGE im 1600 L-Reaktor. Die Differenzierung erfolgte mit 18S-rRNA spezifischen Amplifikons auf einem 8%-iges Harnstoff-Formamid Gel. Die isolierten DNA Proben wurden mit 1427–1453f* und 1616–1637r Primern amplifiziert. Die Spuren 1-15 repräsentieren die unterschiedlichen Wochen (1-15) der Probennahme in 7-tägigen Abständen. Grün umrandete Banden (a-s) wurden sequenziert (siehe Vorgang in 3.6.). (a) *Auxenochlorella protothecoides*, (b) *Tetradesmus dimorphus*, (c) *Microsporidium sp.*, (d) *Schroedera plumatellae*, (e) *Loxophyllum sp.*, (f) *Micractinium sp.*, (g) unkultivierbarer Chrysophyte., (h & i) *Salpingoeca napiformis*, (j) *Chlorella sp.*, (k) *Salpingoeca napiformis*, (l) *Micractinium sp.*, (m) *Neocystis mucosa*, (n) *Vampyrella lateritia*, (o) unkultivierbarer Goniomonas, (p) *Scenedesmus sp.*, (q) *Zoothamnium sp.*, (r) unkultivierbarer Eukaryote, (s) unkultivierbarer Cryptomycota.

Die Eukaryotendiversität der 1600 L Pilotanlage (Abb. 19) wurde während einer 15-wöchigen Laufzeit mittels DGGE untersucht. Sowie im kleineren Reaktor war auch im Großen die Diversität innerhalb der ersten fünf Wochen sehr hoch. Dies ist ebenfalls im Chlorophyllgehalt wieder zu erkennen. Dieser lag in den ersten 5 Wochen zwischen 7-10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Doch bereits ab der sechsten Woche war eine Abnahme der Bandenzahl zu erkennen. Betrachten man die Banden f, i, j, m, o, q und r, waren diese 7 Banden durch ihre distinkte und starke Intensität in den ersten vier Wochen repräsentativ. Zum einen konnten die drei Banden f, j und m dem Phylum Chlorophyta zugeordnet werden und zum anderen ergab die Sequenzanalyse der Bande f eine Ähnlichkeit von 98% *Micractinium sp.*, Bande j

99% *Chlorella sp.* und Bande m 96% *Neocystis mucosa*. Die Banden a, d, e, k und n tauchten inkonsequent innerhalb der ersten fünf Wochen auf. Ab der sechsten Woche ist die Bandenanzahl gesunken und ein stabiles Muster pendelt sich bis zum Versuchsende ein. Dabei waren sechs Banden mit der Bezeichnung j, m, o, q und r charakteristisch. Der Vergleich der Sequenzen mit der NCBI Datenbank konnten die Bande j mit 99% *Chlorella sp.*, die Bande m mit 96% *Neocystis mucosa*, die Bande o mit 94% einer unkultivierbaren Goniomonas Gruppe, die Bande q mit 84 % *Zoothamnium sp.* und die Bande r mit 99% unkultivierbarer Eukaryote identifiziert werden. Im gesamten Versuchszeitraum wurde Bande c, j, l, m, o, q und r zu jeder Messwoche detektiert.

Die Eukaryoten Diversität des 1600 L-Reaktors wurde mittels DGGE-Analyse untersucht. Dabei wurden die 18S-rRNA-Genfragmente (grün umrandeten Banden a-s) aus dem DGGE-Gel sequenziert. Die Sequenzanalyse mit den nächsten Verwandten ist in der Tab. 14 aufgelistet.

Tab. 14: Analyse der nächsten Verwandten Arten im 1600 L-Reaktor. Die 18S-rRNA-Genfragmente wurden für die phylogenetische Einordnung aus dem DGGE-Gel extrahiert, sequenziert und mit der NCBI Datenbank auf Sequenzidentität der nächsten Verwandten verglichen.

Bande	Phylogenetische Gruppe	Phylogenetische Zuordnung (Accession)	Sequenzidentität [%]
a	Chlorophyta	<i>Auxenochlorella protothecoides</i> (KM462820.1)	99
b	Chlorophyta	<i>Tetrademus dimorphus</i> (LC192134.1)	98
c	Fungi	<i>Microsporidium sp.</i> (KR303710.1)	97
d	Fungi	<i>Schroedera plumatellae</i> (AY135024.1)	91
e	Alveolata	<i>Loxophyllum sp.</i> (EU242511.1)	98
f	Chlorophyta	<i>Micractinium sp.</i> (KM243325.1)	98
g	Stramenopiles	Uncultured Chrysophyte (AB749082.1)	97
h	Choanoflagellida	<i>Salpingoeca napiformis</i> (KT757487.1)	91
i	Choanoflagellida	<i>Salpingoeca napiformis</i> (KT757487.1)	95
j	Chlorophyta	<i>Chlorella sp.</i> (KX094759.1)	99
k	Choanoflagellida	<i>Salpingoeca napiformis</i> (KT757487.1)	94
l	Chlorophyta	<i>Micractinium sp.</i> (KM243325.1)	99
m	Chlorophyta	<i>Neocystis mucosa</i> (JQ920366.1)	96
n	Rhizaria	<i>Vampyrella lateritia</i> (HE609040.1)	89
o	Cryptophyta	Uncultured Goniomonas (JF791064.1)	84
p	Chlorophyta	<i>Scenedesmus sp.</i> (KR025877.1)	97
q	Alveolata	<i>Zoothamnium sp.</i> (DQ868354.1)	84
r	Eukaryote	Uncultured Eukaryote (LC150088.1)	99
s	Fungi	Uncultured Cryptomycota (LC150088.1)	98

Aus der Tab. 14 geht hervor, dass die Eukaryoten Diversität im 1600 L-Reaktor mit verschiedenen Gruppen vertreten ist. Das Phylum Chlorophyta ist durch die Banden a, b, f, j, l, m, o und p vertreten. Die Domäne der Pilze mit dem Phylum Microsporidia wurde in den Banden c und d der Spezies *Microsporidium sp.* (97%) und *Schroedera plumatellae* (91%) nachgewiesen. Außerdem konnte die Choanoflagellat-Spezies *Salpingoeca napiformis* in den Banden h, i und k identifiziert werden.

Die DGGE-Profile beider Anlagen waren anhand der Bandenmuster sehr ähnlich. Durch die Sequenzierung der einzelnen Banden wurde die Bande g im 800 L und die Bande j im 1600 L Reaktor eindeutig *Chlorella sp.* zugeordnet. Ebenfalls wurde die Bande h (800 L) und m (1600 L) in beiden Reaktoren als *Neocystis mucosa* Spezies nachgewiesen.

Um eine quantitative Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft in den Reaktoren zu bekommen wurde für den 800 L-Reaktor eine Sequenzierung in der 2., 8. und 15. Woche mittels MiSeq/Illumina NGS-Technologie durchgeführt.

Tab. 15: Zusammenfassung der Miseq Reads vor und nach der Bearbeitung für die Proben in der 2., 8. und 15. Woche.

	Woche 2	Woche 8	Woche 15
Raw reads	587913	502380	554208
Reads after quality clipping	532141	440981	495003
Reads after OUT clustering	530000	440000	490000
OTUs	228	314	224

Die Tab. 15 enthält eine Zusammenfassung der Raw- und Quality Clipping Reads, sowie die generierten Reads nach dem OTU Clustering und die gesamt OTUs aus den Proben des 800 L-Reaktors in der 2., 8. und 15. Woche mittels MiSeq Analyse. Die Readsanzahl nach der Quality Clipping unterscheidet sich zwischen den Proben. Die Probe 2 hat die meisten Reads mit ca. 530000. In der Probe 8 wurden 90000 weniger und Probe 15 40000 weniger generiert als in Probe 2. Betrachtet man die gesamt OTUs der Proben ist erkennbar, dass die Probe 2 und 8 eine ähnliche Anzahl von ca. 220 OTUs haben. Dagegen hat die Probe 8 ca. 100 OTUs mehr bei weniger Reads.

Für eine quantitative Untersuchung der mikrobiellen Gemeinschaft des 800 L-Reaktors wurde eine NSG (*Next Generation Sequencing*) für die 2., 8. und 15. Woche durchgeführt. Dafür wurde die gesamt DNA isoliert und mit den Primer 515F/806R die variable V3- und V4-Region der 16S-rRNA amplifiziert. Die Amplikons fanden anschließend Verwendung in einer

MiSeq/Illumina-Sequenzierung. In Abb. 20 wurden die MiSeq Ergebnisse der drei Proben zur taxonomischen Einordnung auf der Phylum Ebene grafisch dargestellt.

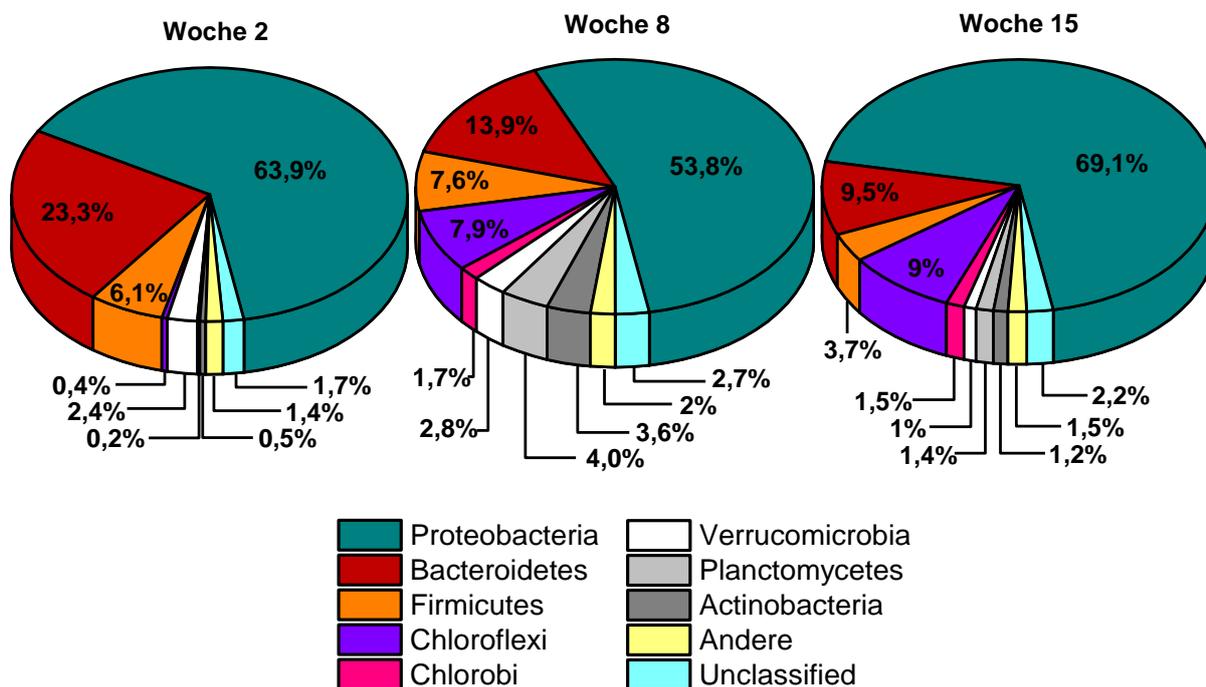


Abb. 20: Relative Häufigkeiten phylogenetischer Gruppen in der Pilotanlage (800 L) zu den Zeitpunkten 2., 8. und 15. Woche. Darstellung der bakteriellen Zusammensetzung auf Phylumebene.

Die quantitativen Veränderungen der bakteriellen Zusammensetzung auf Phylumebene des 800 L-Reaktors ist in der Abb. 20 zu erkennen. Es wird deutlich, dass mehr als 50% des gesamten Datensatzes in das Phylum Proteobacteria zusammengefasst wurden. Dabei lag der Anteil der Proteobacteria in der zweiten Woche des Versuchszeitraums bei 63,9%, nahm in der 8. Woche auf 53,8% ab und erreichte in der 15. Woche 69,1%. Die generierten Sequenzen für das Phylum Bacteroidetes konnte durch stetige Abnahme von 23,3% auf 13,9% und zum Schluss auf 9,5% detektiert werden. Hierbei gehörten $\frac{3}{4}$ der Vertreter der Klasse Sphingobacteriia an. Das Phylum Firmicutes bleibt in den ersten zwei Zeitpunkten mit 6% bis 7% stabil. In der 15. Woche wurde ein Rückgang auf 3,7% verzeichnet. Dagegen lag eine Ansammlung von Chloroflexi Vertretern in der zweiten Woche bei 0,4%, etablierten sich in der 8. und 15. Woche auf einen Anteil von 8 bis 9% in der bakteriellen Zusammensetzung des 800 L-Reaktors.

Da die bakterielle Zusammensetzung auf Phylumebene zu allen drei Zeitpunkten zu mehr als 50% aus Proteobacteria vertreten war, wurden die einzelnen Klassen der Proteobacteria näher analysiert. Die Datensätze der Proteobacteria in den einzelnen Wochen wurden auf 100% gesetzt.



Abb. 21: Relative Häufigkeiten innerhalb der Proteobacteria Klassen Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta- und Epsilonproteobacteria. Der Datensatz der Proteobacteria wurde auf 100% gesetzt.

Die Populationsanalysen ergaben eine Veränderung der detektierten Häufigkeiten der einzelnen Klassen der Proteobacteria, insbesondere der Alpha-, Beta- und Gammaproteobacteria von der 2. über die 8. bis zur 15. Woche (Abb. 21).

Die Alphaproteobacteria starteten mit einem Anteil von ca. 15%, gewannen in der achten Woche einen Zuwachs auf ca. 58%, der sich in der 15. Woche wieder auf ca. 18% verringerte. Betrachtet man die Gattungsebene (Abb. 22) in der 8. Woche, war eine starke Zunahme in den Ordnungen Rhizobiales, Sphingomonadales und Rhodobacterales detektiert. In der zweiten Woche wurden ca. 43% der Vertreter der Klasse Betaproteobacteria zugeordnet. Anhand der taxonomischen Einordnung des Clusters durch repräsentative Sequenzen wurden ca. 40% der Ordnung Burkholderiales eingeordnet. Hierbei wurden ca. 34 % *Rubrivivax* und ca. 5% *Hydrogenophaga* zugeordnet. In der 8. und 15. Woche nahmen die Vertreter der Betaproteobacteria rapide ab, zunächst auf 10% und zum Schluss auf 4%. Der Anteil der Gammaproteobacteria lag in der zweiten Woche ca. bei 30%, in der 8. Woche bei 21% und in der 15. Woche bei über 70%. Dabei gehören die Hauptvertreter der Ordnung Thiotrichales, die in der 8. Woche durch die Ordnung Xanthomonadales und Chromatiales stark verdrängt wurde. Zum Schluss wurde mehr als 60% der dominierenden Ordnung Thiotrichales zugeordnet. Die Veränderung der Häufigkeiten von Deltaproteobacteria lag im einen kleineren Bereich. Die Untersuchungen ergaben in der 2. und 8. Woche ca. 9% und zum Ende eine Reduzierung auf 6%. Die Vertreter der Epsilonproteobacteria lagen zu jedem Zeitpunkt unter 1%.

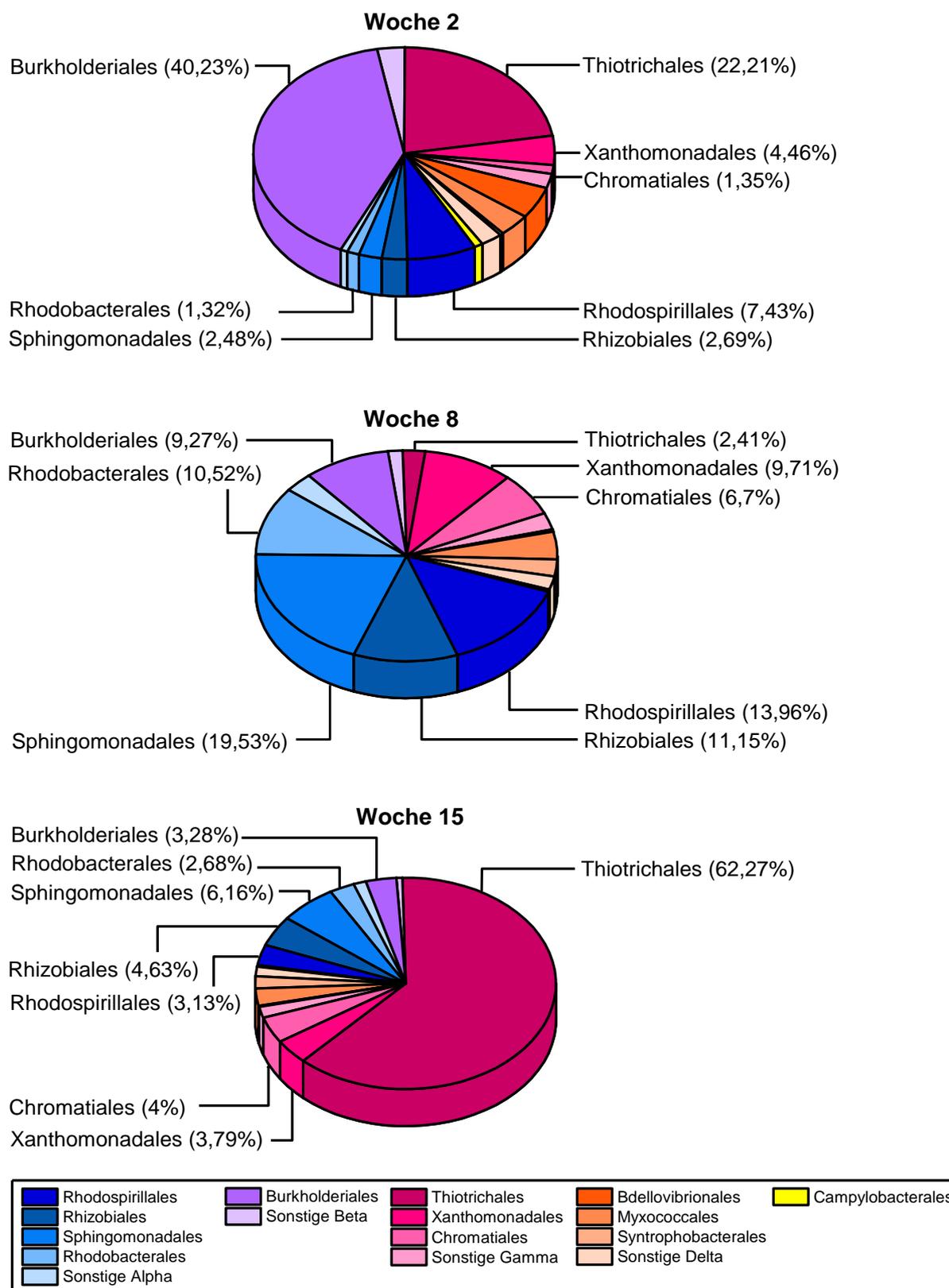


Abb. 22: Relative Häufigkeiten innerhalb der Ordnungsebene der Klassen Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta- und Epsilonproteobacteria. Der Datensatz der Proteobacteria wurde auf 100% gesetzt

Die auf der MiSeq Sequenzierung basierenden Ergebnisse gaben einen weiteren Einblick in die Veränderung der bakteriellen Diversität, während der Abwasserreinigung mittels

Mikroalgen-Technologie. Zusätzlich ist eine quantitative bakterielle Zusammensetzung gegeben. Daraus wurde die Erkenntnis gewonnen, dass die Ordnung der Thiotrichales mit der Spezies *Thiotrix* als dominanter Schlüsselorganismus in der 15. Woche im 800 L-Reaktor fungierte.

4.2 Sauerstoffdynamik

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist die Sauerstoff- und Lichtproblematik in einem mit mikroalgenbetriebenen Abwasserreinigungssystem durch ein sehr niedrige bis keine Detektion des Sauerstoffs gekennzeichnet.

Die klassische Darstellung der Photosyntheseleistung basiert auf Messungen der Sauerstofffreisetzung im Verhältnis zur Lichtintensität (PI-Kurve). Die PI-Kurve wurde mit Hilfe der Steigung der Sauerstoffkonzentration bei einzelnen Lichtintensitäten erstellt. Eine schnelle Methode ist die Erstellung der Rapid Light Curves (RLC) mittels Dual Pam. Diese Lichtkurven liefern detaillierte Informationen über den Sättigungswert des Elektronentransports, sowie die gesamte photosynthetische Leistung einer Probe. Bei beiden Wegen ist anschließend die Berechnung der Photosyntheseparameter α (Steigung), I_k (Lichtsättigungspunkt) und P_{max} (maximale Photosyntheseproduktionsrate / Elektronentransportrate) aus den erstellten PI-Kurve möglich.

In den nächsten Abschnitten wurde die Sauerstoff- und Elektronentransportdynamik bezogen auf die Gesamtprobe der Mikroalge *C. vulgaris* bei unterschiedlicher Zelldichte untersucht. Zusätzlich wurden Parameter wie Chlorophyllmenge und Trockensubstanz als Hilfsindikatoren mit aufgenommen.

4.2.1 Sauerstoff Charakteristika von *C. vulgaris*

Im folgendem Abschnitt wurde die strahlungsabhängige Sauerstoffproduktion der unialgalen Mikroalge *C. vulgaris* (MZCH Nr. 10162) bei unterschiedlicher Zelldichte untersucht. Der Ablauf wurde wie in 3.7.1 beschrieben durchgeführt. Aus den erstellten PI-Kurven wurden anschließend die Photosyntheseparameter Lichtsättigungspunkt, Kompensationspunkt, Respirationsrate und maximale Sauerstoffproduktionsrate berechnet und in einer Grafik zusammenfassend dargestellt (siehe Abb. 23 und Abb. 24).

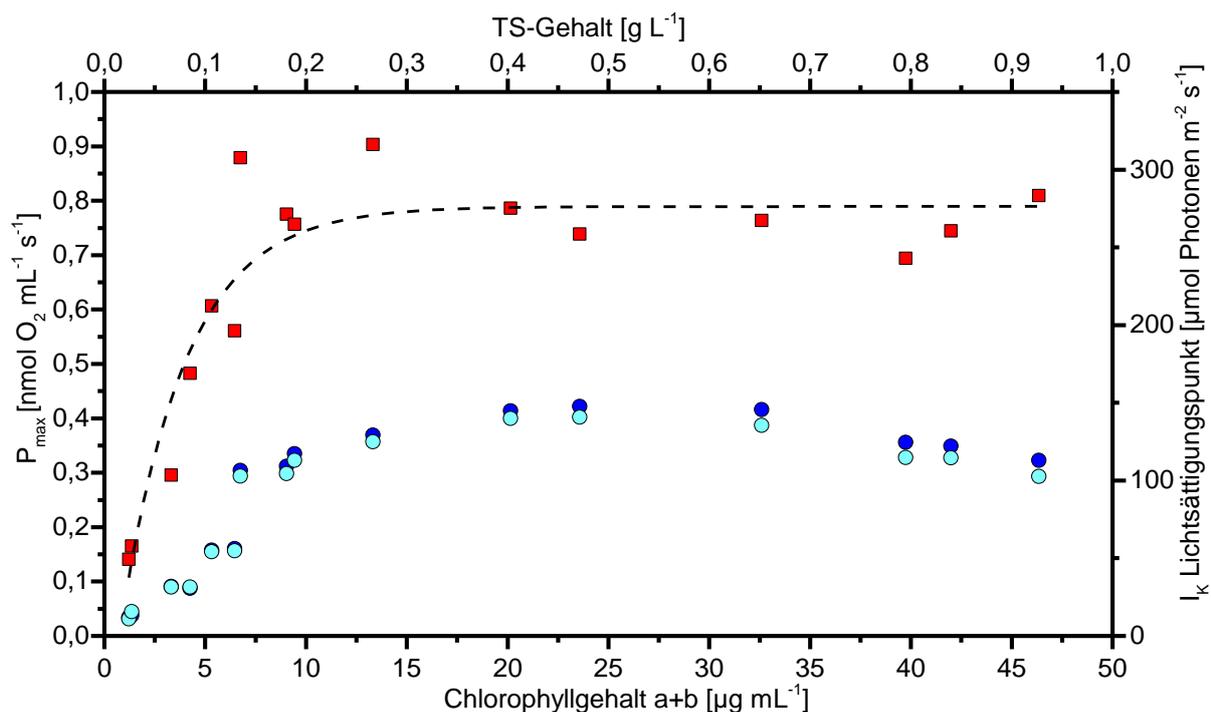


Abb. 23: Zusammenfassung aller Photosynthese-Lichtkurven (PI-Kurve) unterschiedlicher Zelldichten (TS) und den dazugehörigen Chlorophyllgehalten von *C. vulgaris* (n=1). Die Parameter Lichtsättigungspunkt I_k (■), maximale Sauerstoffproduktionsrate P_{max} (●) und maximale Sauerstoffproduktionsrate mit Respiration P_{max} (○) wurden nach dem Modell von Jassby & Platt (1976) ermittelt. Der Verlauf der Lichtsättigungspunkte wurde mit einer asymptotischen Linie durchgezogen.

Aus der heranwachsenden *C. vulgaris* Kultur wurde täglich eine Menge von ca. 150 mL entnommen und zum einen für die Erstellung der PI-Kurve und zum anderen für die Bestimmung des Chlorophyll- und Trockensubstanzgehaltes verwendet. Mit zunehmenden Trockengewicht blieb der Chlorophyllgehalt pro Zelle gleich (siehe linearer Zusammenhang Abb. 24a).

Die Analysen ergaben einen optimalen Sauerstoffproduktionsbereich abhängig von der Algenkonzentration (Abb. 23). Dieser Bereich lag zwischen 10 bis 45 µg mL⁻¹ Chlorophyll a+b mit einer max. Produktionsrate von 0,3 bis 0,4 nmol O₂ mL⁻¹ s⁻¹. Auch wird deutlich, dass der Lichtsättigungspunkt mit höherer Zelldichte anstieg, da immer weniger Licht in die Kultur eindrang. Es wurde eine höhere Lichtintensität benötigt um den Sättigungspunkt zu erreichen. Der lineare Bereich lag bis 0,2 g L⁻¹ Biomasse Algen (ca. 10 µg mL⁻¹ Chlorophyll a+b) und der stationäre Bereich ab 0,2 bis 1 g L⁻¹. Der Lichtsättigungspunkt lag ab ca. 0,2 - 1 g L⁻¹ TS durchschnittlich bei 280 µmol Photonen m⁻² s⁻¹.

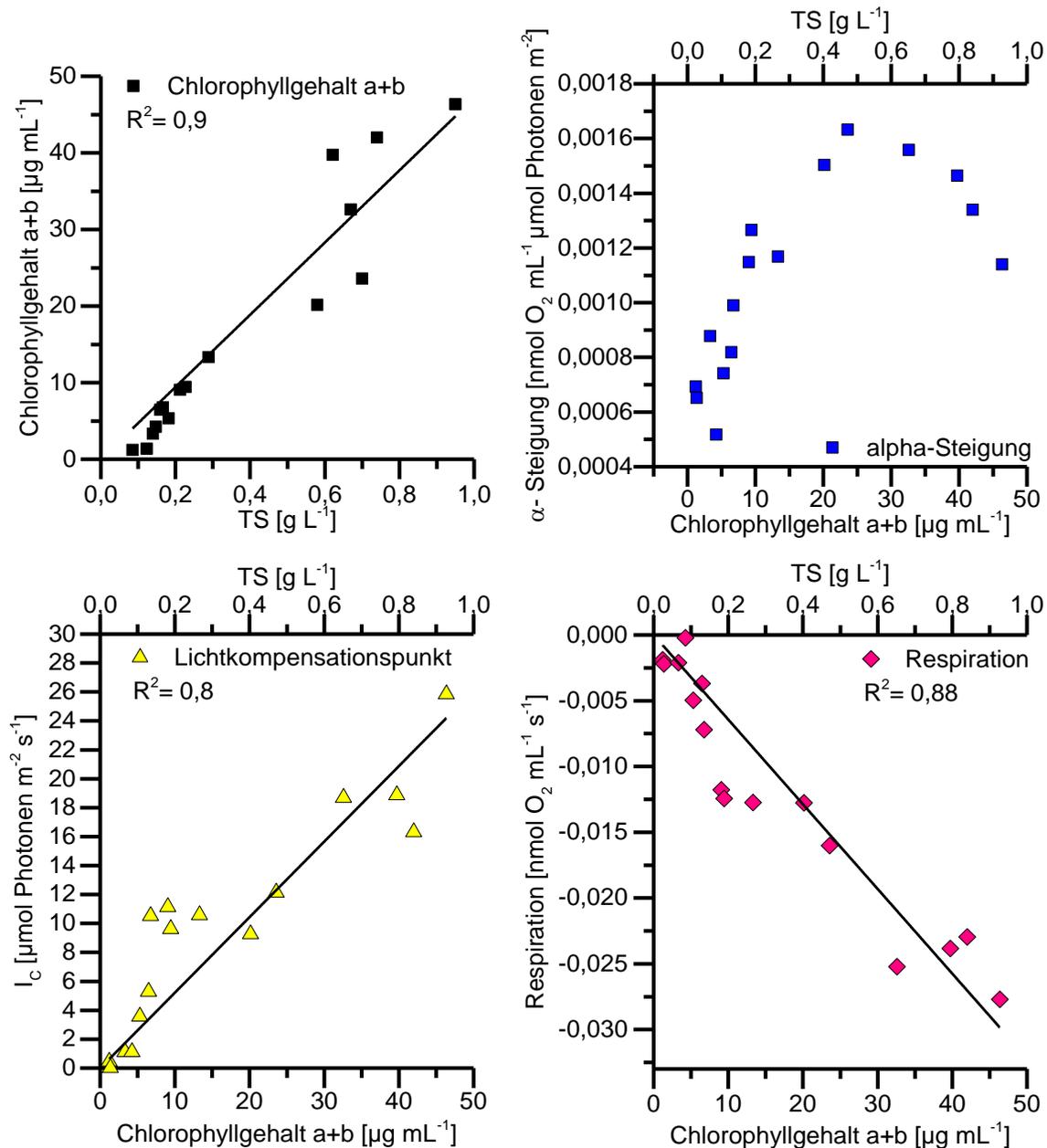


Abb. 24: Zusammenfassung aller erhobenen PI-Kurven unterschiedlicher Zelldichten (TS) von *Chlorella vulgaris*. Die Parameter α -Steigung, Lichtkompensationspunkt und Respiration wurden nach dem Modell von Jassby & Platt (1976) ermittelt. Eine lineare Kurvenanpassung wurde durchgeführt bei Chlorophyllgehalt und TS, Chlorophyllgehalt und Lichtkompensationspunkt und Chlorophyllgehalt und Respirationsrate.

Die lineare Regression in Abb. 24 bestätigt einen linearen Zusammenhang zwischen Chlorophyllmenge und Trockensubstanz ($R^2=0,9$). Bei steigendem Chlorophyllgehalt stieg α linear bis ca. $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ an. Anschließend war eine Reduzierung zu verzeichnen. Zwischen den berechneten Lichtkompensationspunkt und der Chlorophyllmenge war ein linearer Zusammenhang ($R^2=0,8$) vorhanden. Der Lichtkompensationspunkt beschreibt die benötigte

Lichtintensität für die Mikroalgen, die den Sauerstoffverbrauch (Atmung) und die Sauerstoffproduktion (Photosynthese) ausbalanciert. Der Lichtkompensationspunkt stieg mit höherer Zelldichte linear an. Bei höherer Zelldichte war der Sauerstoffverbrauch und Sauerstoffproduktion höher, wodurch eine höhere Lichtintensität benötigt wurde, um den Lichtkompensationspunkt zu erreichen. Die Zunahme der Respiration mit steigender Zelldichte war ebenfalls linear ($R^2=0,87$). Je mehr Mikroalgen vorhanden waren, desto mehr wurde respiriert.

Diese Untersuchungen ergaben einen optimalen Sauerstoffproduktionsbereich abhängig von der Algenkonzentration. Bei der Zelldichte von $0,2-1 \text{ g L}^{-1}$ wurde ein stationärer Bereich für die maximale Sauerstoffproduktionsrate erreicht. Gleichzeitig lag in diesem Bereich der Lichtsättigungspunkt unverändert bei ca. $280 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

4.2.2 Elektrontransport Charakteristika von *C. vulgaris*

Für die Erstellung der Rapid Light Curves (RLC) mittels Dual Pam wurde *C. vulgaris* im Multikultivator bei 20°C bei einer Bestrahlungsstärke von $200 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ im Tag-Nacht Rhythmus 14:10 kultiviert. Die Durchführung erfolgte wie in 3.7.3 beschrieben. Täglich wurden Proben entnommen um RLC zu erstellen und Chlorophyllgehalt a+b und TS zu bestimmen. Aus den RLC wurden die Parameter α (Steigung), I_K (Lichtsättigungspunkt) und ETR_{max} berechnet und in Abb. 25 dargestellt.

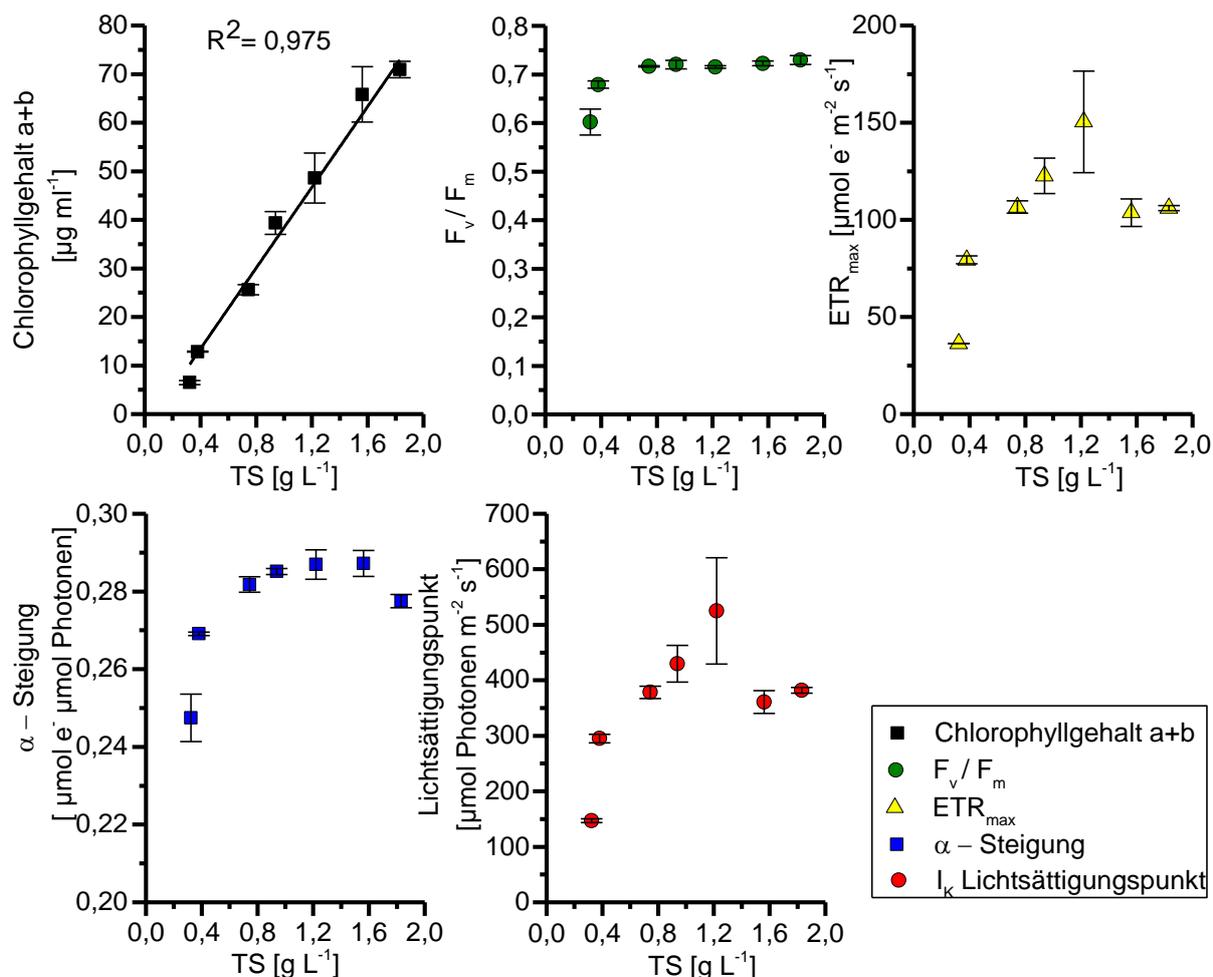


Abb. 25: Zusammenfassung aller erhobenen RLC unterschiedlicher Zelldichten (TS) von *C. vulgaris*. Die Parameter Chlorophyll a+b, F_v/F_m , ETR_{max} , α -Steigung und Lichtsättigungspunkt wurden ermittelt. Eine lineare Kurvenanpassung wurde bei Chlorophyllgehalt und Trockensubstanz durchgeführt. ($n=3 \pm SD$).

Ebenfalls bestätigten die Kultivierungsergebnisse im Multikultivator einen linearen Zusammenhang ($R^2=0,97$) zwischen TS und Chlorophyllgehalt (Abb. 25). Die F_v/F_m Werte der Kultur steigen von 0,6 auf 0,7 und blieben dann konstant. Bei steigender Zelldichte erhöhte sich die maximale Elektronentransportrate der Gesamtprobe. Die Ergebnisse ergaben einen optimalen ETR_{max} -Bereich abhängig von der Algenkonzentration. Ab ca. 0,8-1,2 g L⁻¹ Biomasse lag die maximale Elektronentransportrate bei ca. 120 $\mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Bei den Biomassen von 1,6-2 g L⁻¹ sank die maximale Elektronentransportrate wieder ab auf ca. 100 $\mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Bei höherer Zelldichte war eine Zunahme der Steigung α erkennbar. Stagnierende α -Werte wurden zwischen 0,27 bis 0,28 $\mu\text{mol e}^- \mu\text{mol Photonen}^{-1}$ ab einer Biomasse von 0,8 bis 2 g L⁻¹ detektiert. Der Lichtsättigungspunkt stieg mit höherer Zelldichte an, blieb ab ca. 0,8 bis 2 g L⁻¹ TS unverändert bei durchschnittlich 380 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Immer mehr Licht wurde

benötigt um den Lichtsättigungspunkt zu erreichen. Ab einer Zelldichte von 0,8 bis 2 g L⁻¹ wurde immer gleich viel Licht benötigt um den Lichtsättigungspunkt zu erreichen.

Somit wurden erfolgreich zwei unterschiedliche Methoden angewandt und detaillierte Informationen über die verändernden Sättigungseigenschaften der Sauerstoffproduktions- und Elektronentransportrate von Biomassen-spezifischen *C. vulgaris* untersucht.

4.3 Verhältnisbestimmung Mikroalgen zu Bakterien

Die Reinigungsleistung des hier verwendeten Abwassers wird wesentlich durch biologische Prozesse beeinflusst. Dabei bildet das Zahlenverhältnis von Algen zu Bakterien bei der Abwasserreinigung mittels Mikroalgen-Bakterien einen wichtigen Parameter zur effizienteren Steuerung des Anlagenbetriebes. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals eine automatisierte Lösung entwickelt, die es ermöglichte mittels photometrischer Analysen der Mischprobe, das Zahlenverhältnis von Algen zu Bakterien zu ermitteln. Zunächst wurden im Labormaßstab Abwasser mittels ALBA- Flocken gereinigt (siehe 4.1.1). Die dabei gebildeten stabilen ALBA-Flocken (siehe Abb. 26) wurden anschließend durch vier unterschiedliche Ansätze versucht schonend zu desintegrieren. Denn für die entwickelte photometrische Quantifizierungsmethode war eine homogene Probe ausschlaggebend.

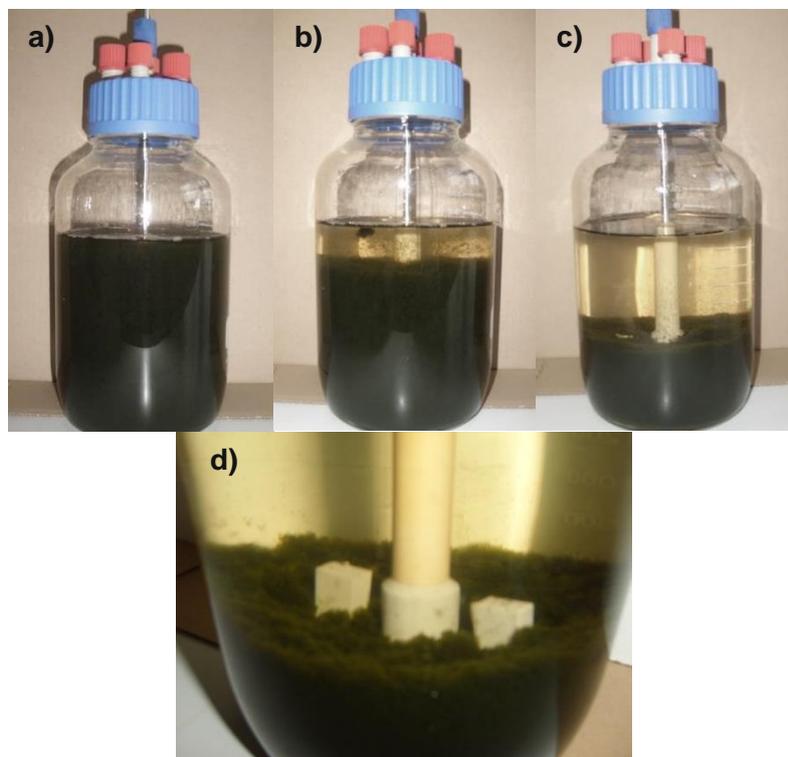


Abb. 26: Sedimentation der ALBA-Flocken im 2 L Laborreaktor. Dargestellt ist a) zu Beginn- durchmischte Probe, b) nach 1 min., c) nach 9 min. und d) nach 17 min.

4.3.1 Desintegrationsassay für ALBA-Flocken

Die Reinigungseffizienz der ALBA-Flocken hängt bereits von unterschiedlichen Startkonzentrationen der beteiligten Bakterien und Mikroalgen ab. Jedoch war es nur bedingt möglich das Zahlenverhältnis beider Partner im laufenden Reinigungsprozess zu bestimmen. Somit beschäftigt sich dieser Teil dieser Arbeit mit der Lösung dieses Problems. Hierfür wurden die Flocken zunächst aufgrund ihrer kompakten Struktur desintegriert. Dafür wurden biologische (Enzymlösung), chemische (Formaldehydlösung), mechanische (bead-beating) und physikalische (Ultraschall) Behandlungen an kompakten Algen-Bakterien-Flocken aus der Abwasserbehandlung getestet, mit der Absicht die beste Desintegrationsbehandlung mit geringem Stress auf die Mikroalgen zu finden.

Um die Auswirkung der Behandlungen auf die Morphologie der ALBA-Flocken zu untersuchen, wurde die Proben mikroskopisch untersucht, als auch quantitativ auf den Trennerfolg mittels Trockensubstanzbestimmung (3.8.2). Zusätzlich wurde die photosynthetische Aktivität mittels PAM-Fluoreszenz gemessen um die Auswirkung der Behandlung zu identifizieren, da stark geschädigte oder aufgeschlossene Algenzellen die Quantifizierung verfälschen würden.

Die biologische Behandlung unter Verwendung verschiedener Enzyme zeigte keine Veränderung im Desintegrationserfolg. Eine Desintegration von $3,33 \pm 3,05\%$ wurde bei einer definierten Konzentration von 1 g L^{-1} für jedes verwendete Enzym erreicht. Das F_v/F_m -Verhältnis änderte sich geringfügig von 0,585 auf $0,524 \pm 0,01$, sodass die photosynthetische Aktivität wenig beeinträchtigt wurde. Die Struktur der Flocken nach der biologischen Behandlung zeigte keine Unterschiede unter dem Mikroskop. Größtenteils wurden kompakte Flocken, kleine Menge an freien Einzelzellen und keine Beschädigung der Zellwand beobachtet. Da keine Auswirkungen erkennbar waren, wurde auf eine graphische Darstellung verzichtet.

Die Ausgangsgröße der ALBA-Flocken wurde vor jeder Behandlung mikroskopisch gemessen. Die durchschnittliche Flockengröße vor der chemischen Behandlung lag bei $164,51 \pm 40,14 \text{ }\mu\text{m}$ und ein TS-Gehalt von $1,03 \pm 0,19 \text{ g L}^{-1}$. Vor der mechanischen Behandlung betrug die durchschnittliche Flockengröße $155,02 \pm 40,40 \text{ }\mu\text{m}$ und die Biomassenkonzentration $1,73 \pm 0,17 \text{ g L}^{-1}$. Die durchschnittliche Flockengröße vor der 120 W Ultraschallbehandlungen betrug $174,54 \pm 50,40 \text{ }\mu\text{m}$ mit einer Trockensubstanz von $3,73 \pm 1,37 \text{ g L}^{-1}$. Bei den 40 W und 80 W Behandlungen wurde eine Flockengröße von $364,1 \pm 141,62 \text{ }\mu\text{m}$ aus den mikroskopischen Bildern berechnet und ein TS-Gehalt von $0,8 \pm 0,12 \text{ g L}^{-1}$ bestimmt.

Die chemische Behandlung erfolgte mittels Formaldehyd und NaOH. Es wurden die Endkonzentrationen 0,2%, 0,6% und 1% verwendet.

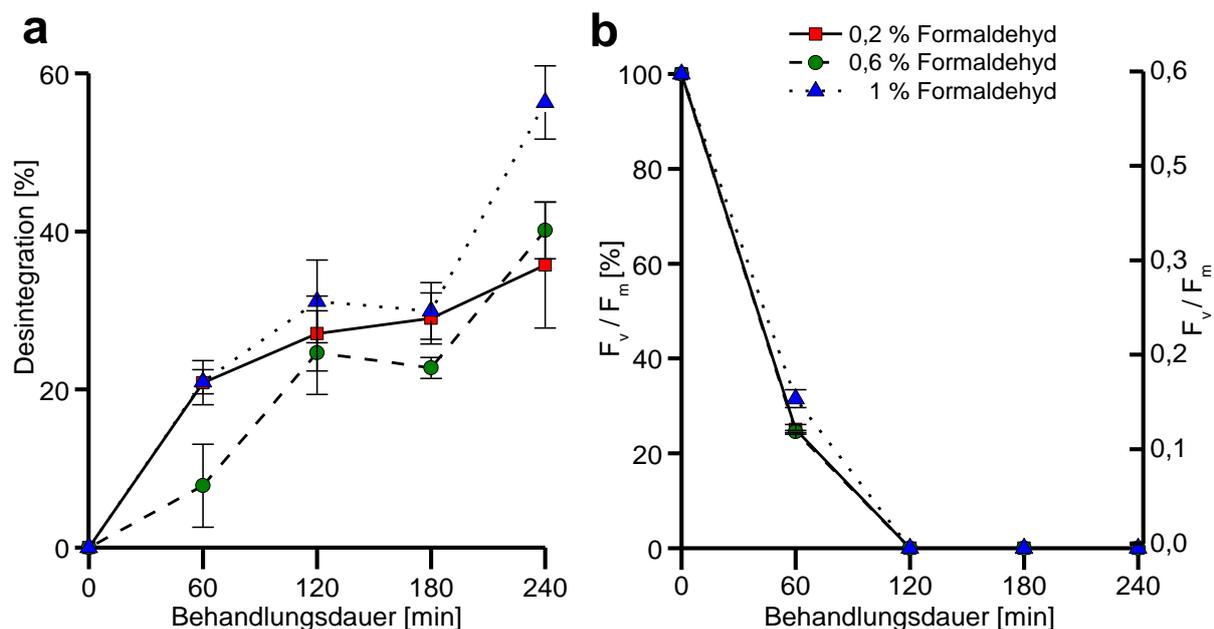


Abb. 27: Darstellung des Desintegrationserfolg von ALBA-Flocken unterschiedlicher Konzentrationen von Formaldehyd, nämlich 0,2%, 0,6% und 1% (a), und die Konsequenz auf die photosynthetische Aktivität, tatsächlichen F_v/F_m und in Prozent des Kontrollwertes (b). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von Triplikaten an.

Die Ergebnisse der chemischen Behandlung zeigten, dass die Flockendesintegration mit zunehmender Formaldehydkonzentration und zunehmender Behandlungsdauer zunahm. Der Desintegrationserfolg der ALBA-Flocken mit der Behandlung von 0,2 und 0,6% Formaldehyd ergab einen signifikanten Unterschied. Die Konzentration von 0,6% Formaldehyd schnitt schlechter, als die Konzentration von 0,2% ab. Erst nach 240 min Behandlung war kein signifikanter Unterschied im Desintegrationserfolg beider Konzentrationen zu sehen. Ein Maximum von $35 \pm 8\%$ und $40 \pm 4\%$ Desintegration wurde erreicht. Bei der Anwendung von 1% Formaldehyd wurde ein Desintegrationserfolg von 20-30% innerhalb der ersten 180 Minuten erreicht. Nach einer 240 minütigen Behandlung wurde eine Desintegration von $56 \pm 5\%$ dokumentiert, die im Vergleich zu den niedrigeren Konzentrationen signifikant höher war. Nach der Zugabe der Formaldehydlösung sank die photosynthetische Aktivität von 100% (F_v/F_m : $0,57 \pm 0,004$) nach 60 min auf 27% (F_v/F_m : $0,15 \pm 0,022$) und nach 120 min auf 0.

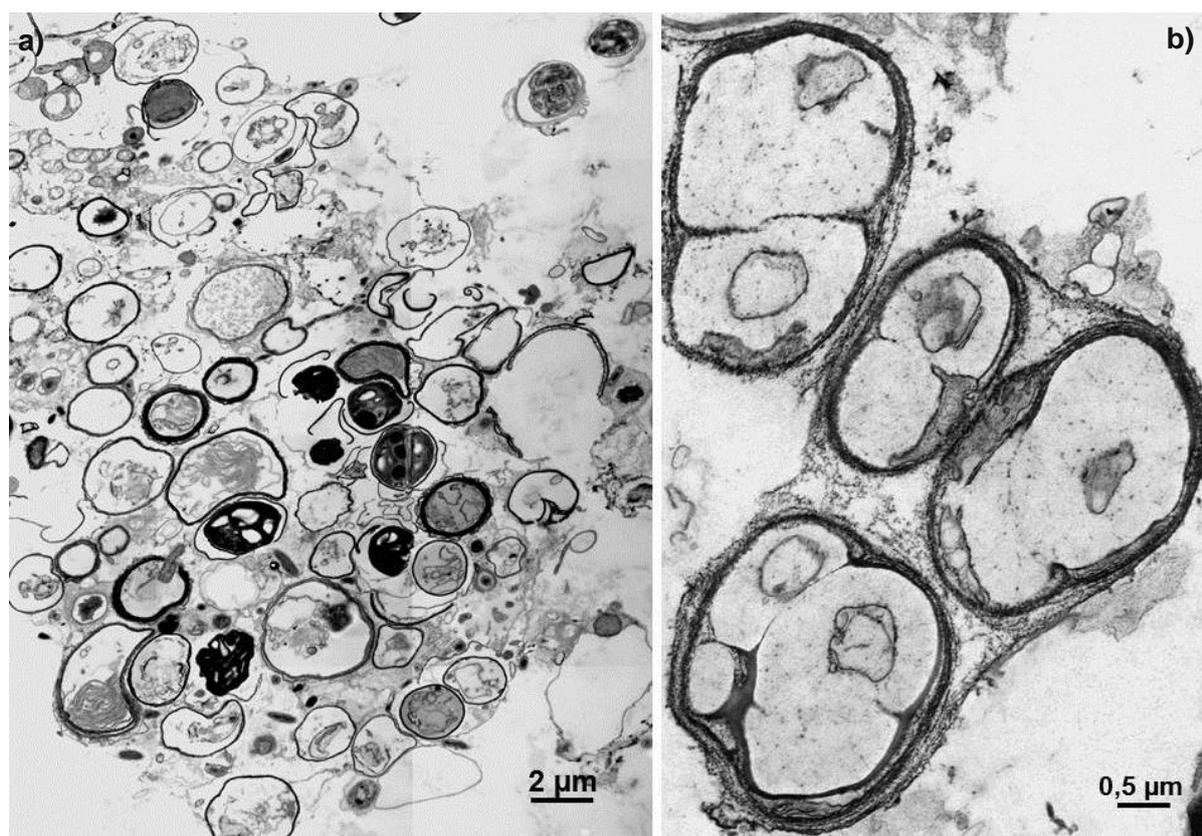


Abb. 28: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der ALBA-Flocken nach der Behandlung mit 1% Formaldehydlösung für 240 min. a) Übersicht eines Querachsenschnitts von ALBA-Flocken mit *Chlorella*-Zellen. b) Nahaufnahme von vier *Chlorella*-Zellen mit einer intakte Zellwand, aber keine regelmäßige innere Strukturen und keine Thylakoidmembranen.

Nach der chemischen Behandlung wurden die Flocken kleiner. Bei der mikroskopischen Beobachtung waren keine intakte *C. vulgaris*-Zellen sichtbar und die Chloroplasten-Membranen erschienen degeneriert. Auch die Transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigten die intakten Zellwände, jedoch ohne regelmäßige innere Strukturen und ohne Thylakoidmembranen (Abb. 28). Die statistische Auswertung wies einen interaktiven Effekt der kombinierten Faktoren Formaldehydkonzentration und der Dauer der Desintegration auf (ANOVA zwischen den Subjektwirkungen: Formaldehydkonzentration, $F_{2;24} = 17,697$, $p < 0,001$, Dauer: $F_{3;24} = 58,374$, $p < 0,001$; Formaldehydkonzentration x Dauer, $F_{6; 24} = 4,185$, $p < 0,005$). Der angewandte Post-hoc-Test stellte fest, dass der Desintegrationserfolg von der Zunahme der Formaldehydkonzentration abhängig war. Für die drei getesteten Formaldehydkonzentrationen wurde ein signifikant höherer Desintegrationserfolg zwischen 0,2% und 1% und zwischen 0,6% und 1% ($p < 0,005$) beobachtet. Es traten keine signifikanten Unterschiede zwischen 0,2% und 0,6% Formaldehydkonzentrationen auf. Ein signifikanter Unterschied trat zwischen verschiedenen Behandlungszeiten ($p < 0,0001$) auf, mit Ausnahme des Vergleichs zwischen 120 und 180 min.

Bei der mechanischen Desintegrationsbehandlung mittels Glasperlen wurden drei unterschiedliche Perlengrößen (1, 2 und 3 mm) mit zunehmender Behandlungsdauer untersucht (Abb. 29a-b).

Die mechanische Behandlung der ALBA-Flocken erfolgte durch verschiedenen Ultraschallstärken (40, 80 und 120W) mit steigender Beschalldauer (Abb. 29c-d).

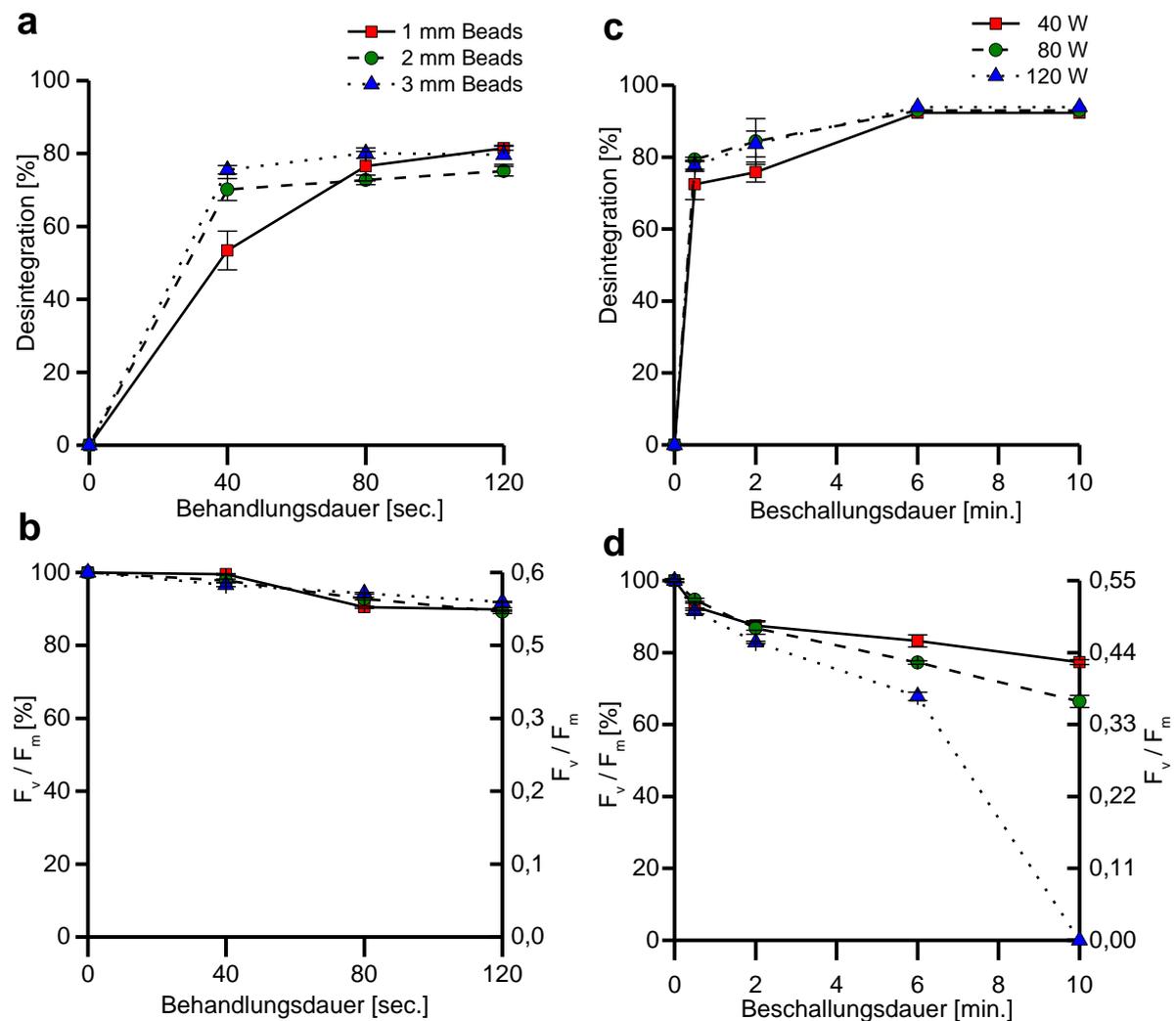


Abb. 29: Darstellung der Desintegrationserfolge bei mechanischer (a-b) und physikalischer (c-d) Behandlung von ALBA-Flocken. Desintegrationserfolg der Flocken bei Behandlung unterschiedlicher Glaskugelgrößen 1, 2 und 3 mm (Geschwindigkeit 4 m s^{-1} ; Frequenz von 50 Hz) (a), und die Konsequenz auf die photosynthetische Aktivität, tatsächlichen F_v/F_m und in Prozent des Kontrollwertes (b). Erfolg der Desintegration durch eine Behandlung mit Ultraschall von 40, 80 und 120 W bei unterschiedlicher Dauer (c) und deren Implikationen für die photosynthetische Aktivität tatsächlich F_v/F_m und in Prozent (d). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von Triplikaten an.

In Abb. 29a sind die Desintegrationserfolge der mechanischen Behandlung von ALBA-Flocken mit unterschiedlichen Glaskugelgrößen dargestellt. Die 1 mm Kügelchen erreichten eine Desintegration von $53 \pm 5\%$ nach 40 Sek. Homogenisierung. Der Desintegrationserfolg

erhöhte sich nach 80 Sek. auf $76\pm 4\%$ und nach 120 Sek. auf $81\pm 0,6\%$. Der Desintegrationserfolg bei der Behandlung mit 2 und 3 mm großen Glaskugeln verlief ähnlich. Der Desintegrationsgrad nahm mit zunehmender Behandlungszeit bei den Kugelgrößen 1 mm auf 2 mm zu. Etwa 72% der Flocken wurden nach 40 Sek., 75% nach 80 Sekunden und ca. 80% nach 120 Sekunden unter Verwendung der größeren Kugeln desintegriert. Die Auswirkung auf das F_v/F_m -Verhältnis der Mikroalgen bei der mechanischen Behandlung war für alle drei Kugelgrößen nahezu gleich (Abb. 29b). Bei allen drei Größen wurde eine maximale Abnahme der Fluoreszenz von $10\pm 0,34\%$ nach 120 Sek detektiert (F_v/F_m von $0,573\pm 0,007$ auf $0,526\pm 0,002$). Die mikroskopischen Ergebnisse der Desintegration der ALBA-Flocken mittels 2 mm Kugeln sind in Abb. 30 dargestellt. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigten, dass die homogenisierende Behandlung mittels Glaskugeln eine signifikante Reduktion der Flockengröße und eine Erhöhung der Menge an freien Zellen bewirkte. Eine Schädigung der Morphologie von *C. vulgaris*-Zellen aufgrund der Behandlung wurde durch mikroskopische Untersuchungen nicht beobachtet. Der Desintegrationserfolg hängt wesentlich von der Dauer der Anwendung ab (Einweg-ANOVA: Behandlungsdauer, $F_{2;24} = 12,230$, $p < 0,001$). Der Post-hoc-Test stellte einen signifikanten Unterschied zwischen der Behandlungszeit von 40 und 120 Sek. ($p < 0,003$) fest. Es wurde jedoch kein Unterschied zwischen der Behandlungsdauer von 40 und 80 Sekunden und von 80 und 120 Sekunden festgestellt. Darüber hinaus, ist laut dem Kruskal-Wallis-Test keine signifikante Zunahme der Desintegration unter Verwendung von 1, 2 oder 3 mm großen Glaskugeln zu beobachten.

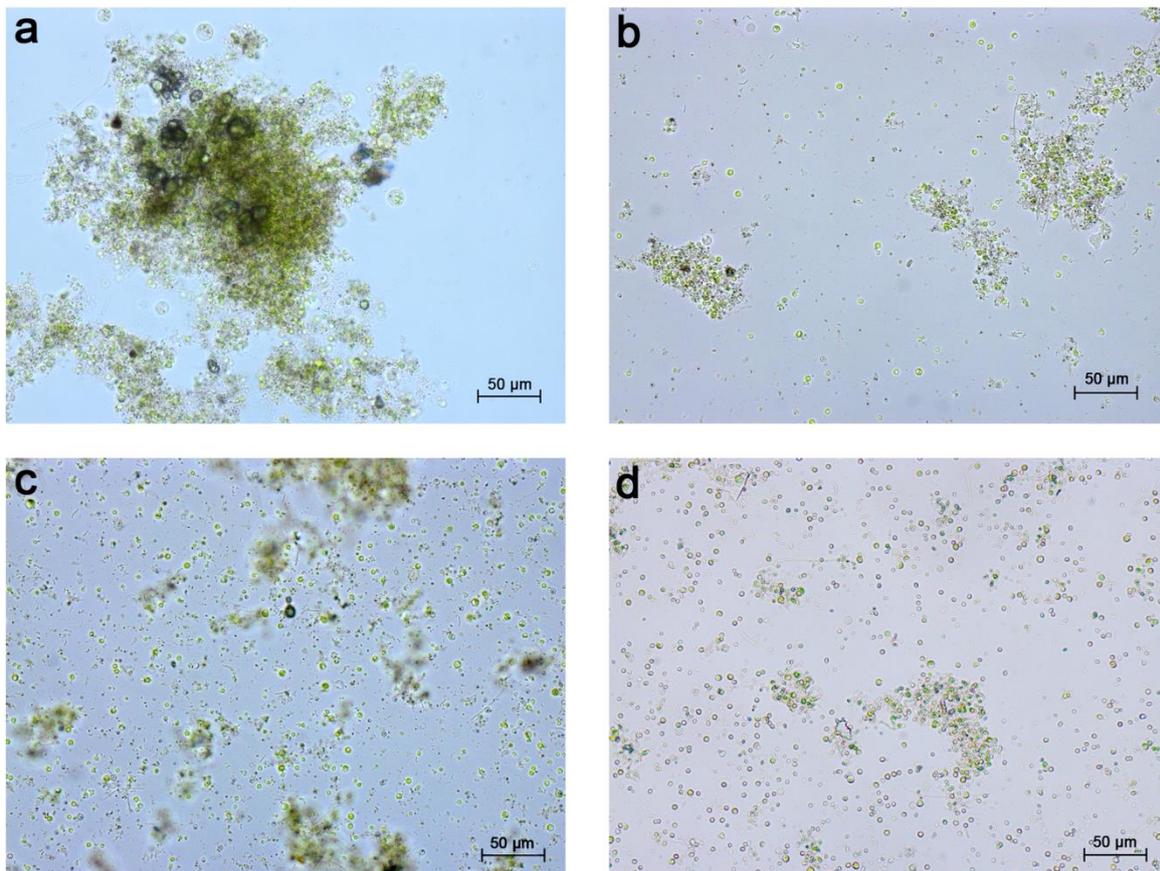


Abb. 30: Mikroskopische Aufnahmen der ALBA-Flocken vor der Behandlung von 2 mm Glasperlen (a) und nach der Desintegration von 40 Sek. (b), 80 Sek. (c) und 120 Sek. (d) Anwendungszeit.

Der Einfluss der physikalischen Behandlung auf den Desintegrationserfolg wurde mittels unterschiedlicher Schalleistungen auf die ALBA-Flocken in Abb. 29c dargestellt. Dabei nahm die Desintegration mit der Beschallungsleistung und der Dauer zu. Bereits 0,5 min 40 W Beschallung erreichte eine $72\pm 4\%$ Desintegration, nach 2 min $75\pm 3\%$. Die maximale Desintegration von 92% wurde nach 6 min mit einer $17\pm 2\%$ -igen Abnahme der photosynthetischen Aktivität erzielt. Eine Beschallungsleistung von 80 W und 120 W erreichten identische Desintegrationsleistungen. Der Desintegrationsgrad hängt von der Ultraschalldauer ab (Kruskal-Wallis-Test, $p < 0,0001$). Jedoch ist ein Unterschied zwischen der Beschallungsleistungen in der photosynthetischen Aktivität (Abb. 29d) der ALBA-Flocken sichtbar. Mit zunehmender Beschallungsleistung und zunehmender Dauer sank die Photosyntheseaktivität stetig. Mikroskopische Beobachtungen zeigten eine signifikante Reduktion der ALBA-Flockengröße. Nach 10-minütiger Behandlung mit 120 W traten viele zerstörte Zellwände auf. Die anderen Ultraschall Einstellungen beeinträchtigten die Morphologie von *C. vulgaris* jedoch nicht.

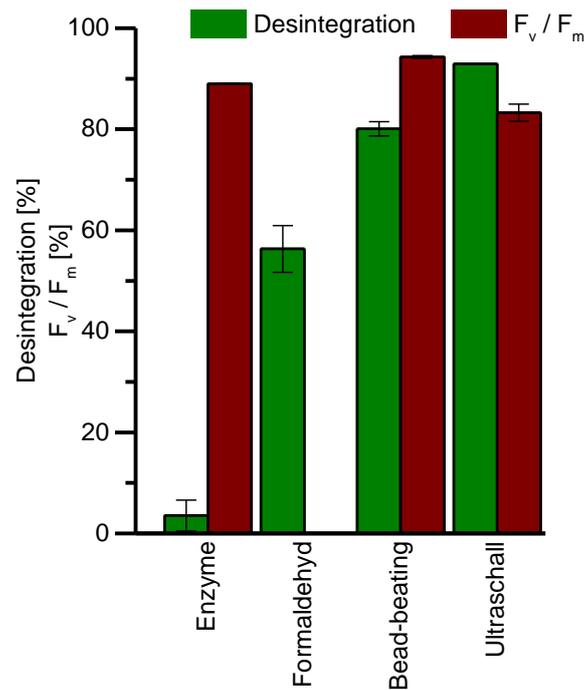


Abb. 31 Darstellung des Desintegrationserfolgs von vier verschiedenen Methoden und den Einfluss auf die photosynthetische Aktivität (F_v/F_m) in Prozent des Kontrollwertes. Verglichen werden die Einstellungen einzelner Methoden mit den besten erzielten Ergebnissen (Enzyme, Formaldehydkonzentration von 1% bei 240 min, 3 mm Glaskugeln für 80 Sek. und Beschallung bei 40 W für 6 min). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von Triplikaten an.

Die höchsten Desintegrationserfolge von Algen-Bakterien-Flocken erreichte die Ultraschallbehandlung und das Bead-beating (Abb. 31). Bei einer Einstellung des Ultraschalls von 40 W, 6 min wurde eine 92% Desintegration erreicht mit 17% -igem Verlust der photosynthetischen Aktivität. Das Bead-Beating erreichte eine 80% -ige Desintegration (3 mm Durchmesser, 80 Sek.) mit einer 6% -igen Abnahme der Photosynthese Aktivität.

Hiermit wurde erstmalig eine Methode entwickelt um Algen-Bakterien-Flocken schonend zu trennen.

4.3.2 Photometrische Quantifizierungsmethode

In dieser Arbeit wurde erstmalig eine Methode entwickelt, um Algen-Bakterien-Flocken schonend zu trennen (4.3.1). Im weiteren Schritt erfolgte die Entwicklung der photometrischen Quantifizierungsmethode.

Ein Vortest erbrachte den Beweis, dass die Extinktionsspektren von Algen und Bakterien sich additiv überlagerten. Dafür wurden die Extinktionsspektren von einer Algenreinkulturprobe und einer Bakterienreinkulturprobe separat gemessen. Anschließend wurde ein Gemisch mit beiden Gruppen, Algen und Bakterien, in gleicher Menge zusammengegeben und das Extinktionsspektrum gemessen (Abb. 32).

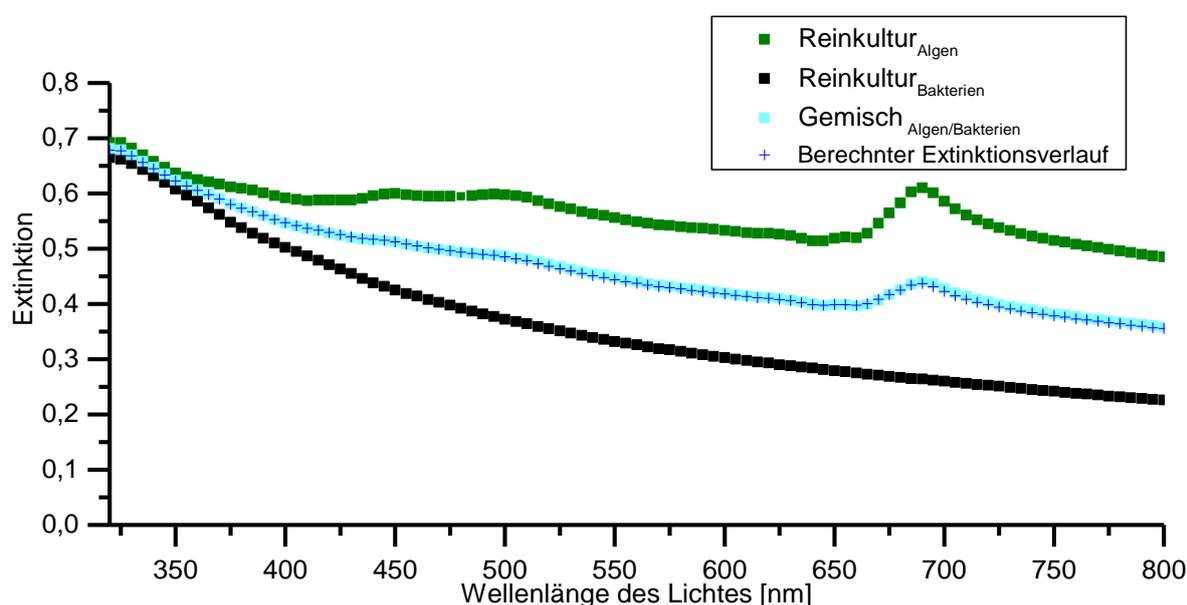


Abb. 32: Darstellung der Extinktionsspektren von Algen- und Bakterienreinkulturen. Das Extinktionsspektrum des Gemisches Algen/Bakterien besteht aus gleichen Anteilen Algen und Bakterienreinkultur in jeweils halber Konzentration. Der berechnete Extinktionsverlauf gibt das Extinktionsspektrum, das sich theoretisch für das Gemisch Algen/Bakterien ergeben müsste, wieder. Dieses wurde anhand der Spektren beider Reinkulturen berechnet. Die Datenpunkte für das Extinktionsspektren von 320 nm bis 800 nm in 5 nm Schritten wurde mit Hilfe eines Photometers erfasst.

In Abb. 32 wird gezeigt, dass sich die Extinktionsspektren von Algen und Bakterien ohne gegenseitige Beeinflussung additiv überlagern. Zusätzlich wurde manuell berechnet, wie das Extinktionsspektrum der Mischprobe theoretisch verlaufen würde. Da in der Mischprobe jeweils die halbe Konzentration beider Gruppen vorlag, wurden die Extinktionsverläufe beider Reinkulturen halbiert und anschließend addiert.

Im nächsten Schritt wurden zwei Koeffizientenmatrizen, in diesem Falle Extinktionsmodelle, erstellt. Zum einen Modell 1, die Aufnahme von Extinktionsspektren (320- 800 nm) von Algen- und Bakterienreinkulturen und die jeweiligen TS-Bestimmungen.

Zum anderen Modell 2, die Aufnahme von Extinktionsspektren von Algen-Bakterien Mischproben, deren Zusammensetzung bekannt ist. Anschließend wurden die Modelle auf die Genauigkeit hinsichtlich der Verhältnisbestimmung überprüft. Es wurden voreingestellte Verhältnisse von 0,25:1, 0,5:1, 1:1, 1,5:1, 2:1 und 3:1 (TS-Algen zu TS-Bakterien) eingestellt. Die Extinktionsspektren der Proben wurde erfasst und zum Schluss wurden die Verhältnisse mit Hilfe der eingespeisten Modelle im MATLAB® berechnet.

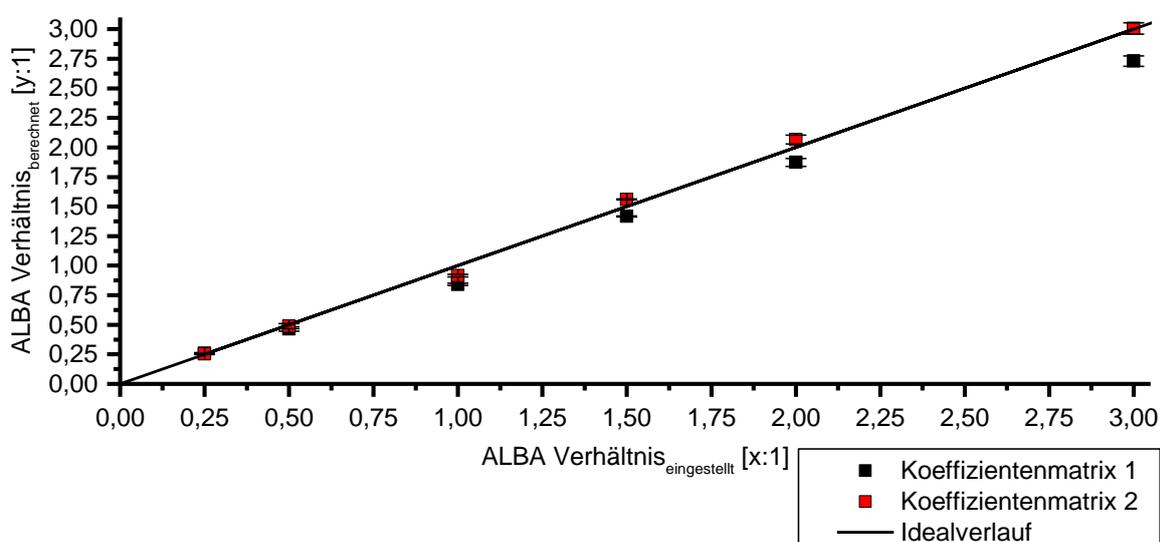


Abb. 33: Vergleich der Übereinstimmung zwischen berechnetem- und eingestelltem TS-Verhältnis von Algen zu Bakterien der Koeffizientenmatrix 1 (Rein-Modell) und der Koeffizientenmatrix 2 (Misch-Modell) (n=3). Die exakte Übereinstimmung zwischen berechnetem und eingestelltem TS-Verhältnis ist durch den Idealverlauf dargestellt.

Die Zahlenverhältnisse Algen zu Bakterien aus bekannten Verhältnisproben wurden mit Hilfe beider Extinktionsmodelle berechnet. Die exakte Übereinstimmung zwischen berechnetem und eingestelltem Verhältnis wurde durch den Idealverlauf dargestellt. Die Genauigkeit des berechnetem zum eingestellten Zahlenverhältnis fiel beim Koeffizientenmatrix 1 etwas schlechter aus, als beim Koeffizientenmatrix 2. Hierbei fielen die berechneten Algenanteile etwas niedriger aus, je höher der Algenanteil war (Abb. 33). Die höchste Abweichung von 0,26 erreichte das Zahlenverhältnis 3:1. Bei dem Extinktionskoeffizienten des Mischmodells (Koeffizientenmatrix 2) erfolgte die Verhältnisbestimmung mit höherer Genauigkeit. Das Verhältnis 1:1 lag im Schnitt um 0,08 zu niedrig, das Verhältnis 2:1 um 0,06 zu hoch. Jedoch ist zu erwähnen, dass aus den voreingestellten Verhältnissen auch die Extinktionskoeffizienten für das Misch-Modell kalibriert wurden. Insgesamt ist keine starke

Abweichung unter den Modellen feststellbar. Bei beiden Modellen lag die Standardabweichung immer unter 0,05.

Anhand der neu entwickelten Quantifizierungsmethode von Mischproben wurden die Dynamik und das Zusammenleben von Bakterien und Algen in der Abwasserreinigung untersucht (siehe 4.4).

4.4 Anwendung

Nach der erfolgreichen Etablierung einer schonenden Desintegrationsmethode der ALBA-Flocken wurde zudem ein photometrisches Quantifizierungsmodell entwickelt (4.3.2). Somit können Verhältnisbestimmungen von Mikroalgen und Bakterien in einer Mischprobe praktikabel und effizient ermittelt werden. Diese beiden Grundbausteine, eine schonende Desintegration und die anschließende Quantifizierung der ALBA-Flocken, ermöglichen nun erstmals in laufenden Systemen Algen-Bakterien Konzentrationen zu ermitteln, dies wurde im nächsten Versuch durchgeführt.

Im folgenden Versuch wurde synthetisches Abwasser in 2 L-Bioreaktoren mittels ALBA-Flocken gereinigt. Die Durchführung erfolgte wie in 3.4.1 beschrieben. Es wurde ein Verhältnis von 2:1 und von 1,5:1 (Algen:Bakterien) eingestellt und über den Versuchszeitraum von 9 Tagen täglich bestimmt. Überprüft wurde der Umsatz der Nährstoffe Ammonium, Phosphat, Nitrit, und Nitrat. Zusätzlich wurde der Trockensubstanz-, Chlorophyll- und CSB-Gehalt bestimmt. Um das Auswirken auf die Sauerstoffverfügbarkeit im System konkret zu charakterisieren, wurde erstmals in dieser Arbeit täglich PI-Kurven von ALBA-Flocken erstellt. Jeden dritten Tag wurde nach der Probeentnahme 200 mL der Stammlösung des synthetischen Abwassers hinzugefügt, um einen Nährstoffmangel vorzubeugen.

In Abb. 34 wurden die Änderungen der Konzentrationen der vier Parameter Trockensubstanz (TS), die photosynthetische Aktivität (F_v/F_m), sowie der CSB-Gehalt des Abwassers und der Chlorophyllgehalt beider Reaktoren dargestellt.

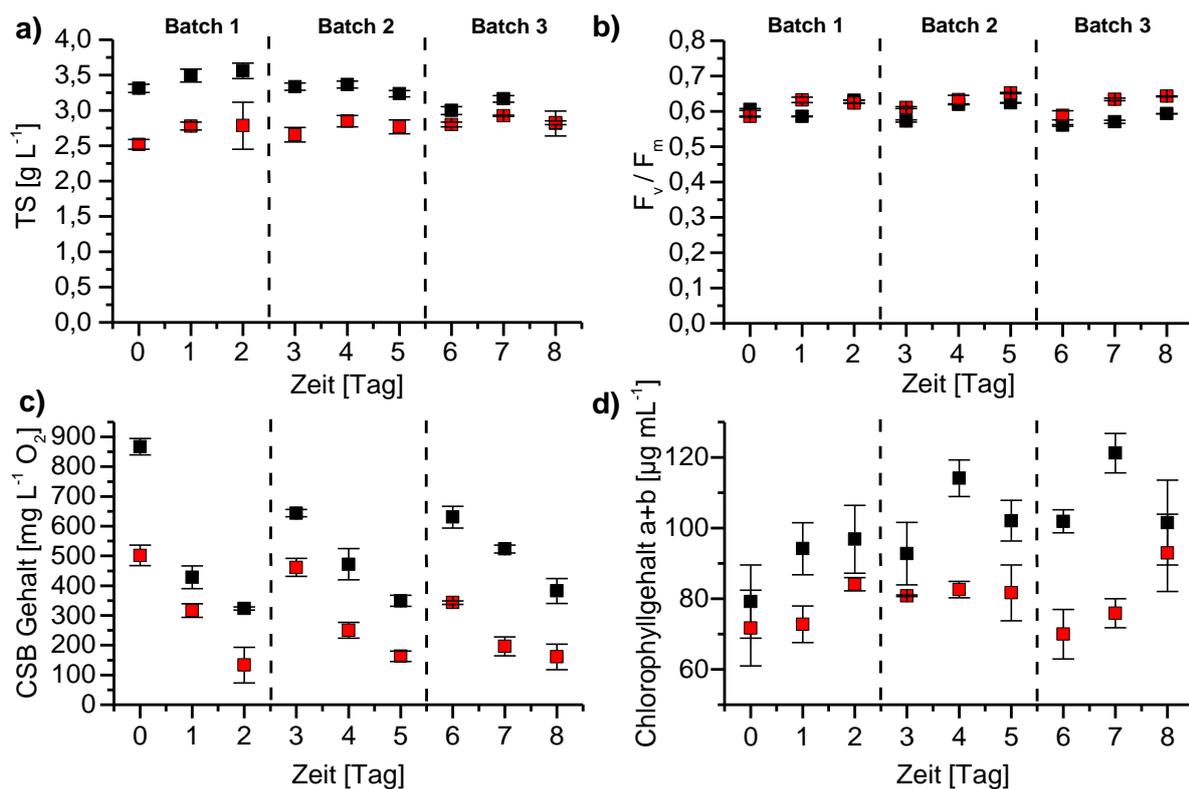


Abb. 34: Überblick der Verläufe aufgenommener Parameter (Trockensubstanzmenge, F_v/F_m , CSB- und Chlorophyllgehalt) unterschiedlich angesetzter Verhältnisse von Algen- zu Bakterienkonzentrationen. Schwarz markierte Symbole zeigen die Verläufe vom Verhältnis 2 zu 1 (■) und in rot 1,5 zu 1 (■). Nach ca. drei Tagen wurde erneut synthetisches Abwasser zugeführt und in Batch Bereiche 1, 2, und 3 mit gestrichelten Linien eingeteilt. Die Daten entsprechen den Mittelwerten von drei Replikaten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Der TS-Gehalt des Reaktors mit dem Start Verhältnis von 2:1 lag bereits zu Beginn bei $3,2 \text{ g L}^{-1}$, etwas höher als das berechnete Gewicht von 3 g L^{-1} . Das Verhältnis 1,5 zu 1 begann mit dem berechneten Gewicht von $2,5 \text{ g L}^{-1}$ (Abb. 34a). Bei beiden Ansätzen nahm die Biomasse im ersten Batch zu. In den weiteren Batch-Versuchen 2 und 3 war ein etwa gleich bleibendes Gewicht zu erkennen. Die leichte Abnahme des TS-Gehaltes am dritten und sechsten Tag ist auf die Zugabe der 200 mL Stammlösung des synthetischen Abwassers zurückzuführen. Zum Ende des Versuchs nähert sich der Verlauf der Trockensubstanz beider Ansätze bei ca. 3 g L^{-1} an. Der F_v/F_m -Wert lag in beiden Ansätzen bei ca. 0,6 an allen Versuchstagen (siehe Abb. 34b). Auch die Änderungen des CSB-Gehaltes des Abwassers waren durch ein wiederkehrendes Muster zyklisch geprägt. In jedem Batchversuch nahm der CSB-Gehalt ab. Der 2:1 Ansatz erreichte am Ende der Batchversuche ein CSB-Wert von durchschnittlich $300 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_2$ und der 1,5:1 Ansatz lag bei durchschnittlich $100\text{-}200 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_2$ (Abb. 34c). Der Chlorophyllgehalt des 2:1 Ansatzes nahm kontinuierlich zu von ca. 80 auf 110 µg mL^{-1} . Auffällig war, dass am mittleren Tag der Batchversuche der Chlorophyllgehalt am höchsten

ist. Dagegen blieb der Chlorophyllgehalt im Ansatz 1,5:1 im Bereich von 70- 90 $\mu\text{g mL}^{-1}$ gleich.

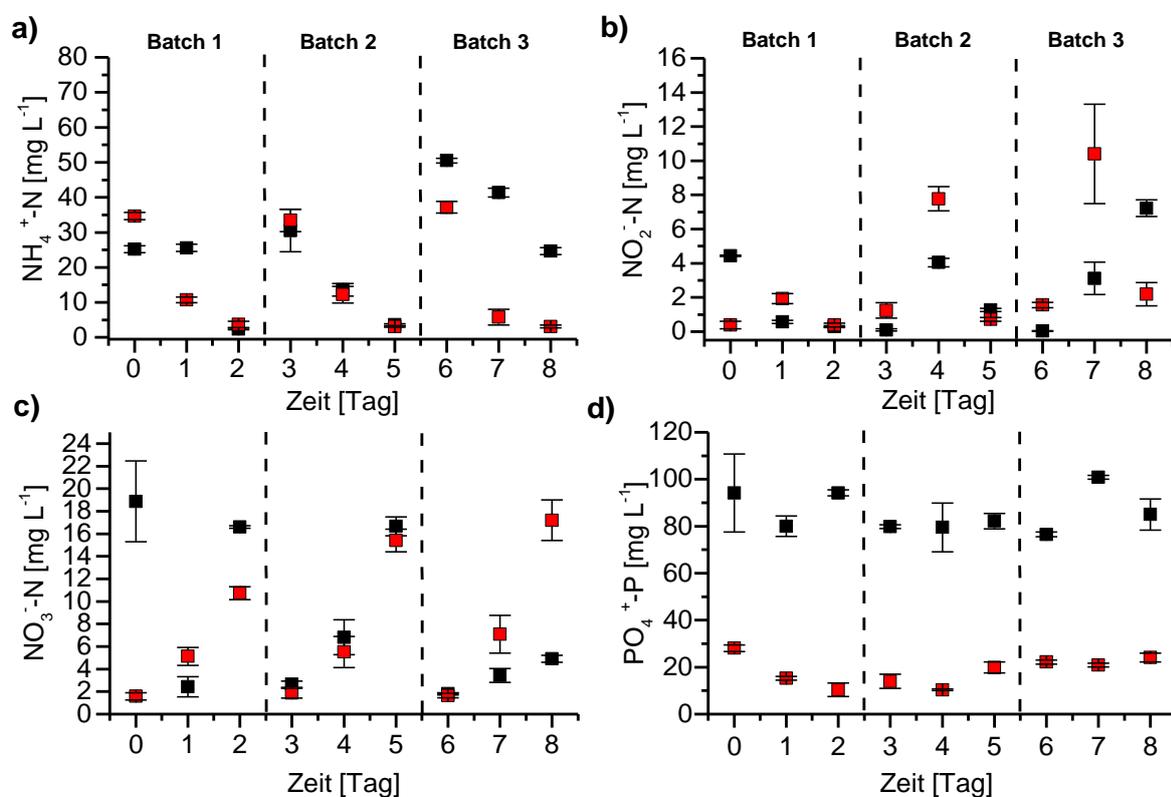


Abb. 35: Verläufe aufgenommener Nährstoffe (Ammonium, Nitrit, Nitrat und Phosphat). Von unterschiedlich angesetzter Verhältnisse von Algen- zu Bakterienkonzentrationen. Schwarz markierte Symbole zeigen die Verläufe vom Verhältnis 2 zu 1 (■) in schwarz und in rot 1,5 zu 1 (■). Nach ca. drei Tagen wurden neues Abwasser (synthetisches) zugeführt und in Batch Bereiche 1, 2, und 3 mit gestrichelten Linien eingeteilt. Die Daten entsprechen den Mittelwerten von drei Replikaten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Die Ergebnisse der Nährstoffanalysen des Abwassers wurde in Abb. 35 beider Ansätze zusammengefasst. In beiden Ansätzen, sowohl 2:1 als auch 1,5:1 sank der Ammoniumgehalt von durchschnittlich 35 mg L^{-1} auf 3 mg L^{-1} in jedem Batchversuch (Abb. 35a). Eine Ausnahme lag im dritten Batch des 2:1 Ansatzes vor, dort wurde ein Ammoniumgehalt von ca. 50 der auf 25 mg L^{-1} sank, gemessen. Im Gegenzug stieg der Nitratgehalt an, von ca. 1,5 auf 5 und dann auf ca. 12 mg L^{-1} (Abb. 35c). Der Nitritgehalt dagegen variierte (Abb. 35b). Beim 2:1 Ansatz nahm dieser im ersten Batch von ca. 4 auf 1 mg L^{-1} ab. Im Zweiten Batch stieg er von 0 auf 4 und nahm dann wieder ab auf 1 mg L^{-1} . Im dritten Batch nahm der Nitratgehalt kontinuierlich zu von 0 auf 3 und dann 7 mg L^{-1} . Beim 1,5:1 Ansatz war ein Muster zu erkennen, von ansteigend und dann abnehmend, jedoch variiert der Messbereich. Bei den Phosphatergebnissen wurde ein hoher

Konzentrationsunterschied zwischen beiden Ansätze gemessen. Der 2:1 Ansatz lag im Bereich von 80-100 mg L⁻¹ und der 1,5:1 Ansatz 10-30 mg L⁻¹.

Die Auswirkungen unterschiedlicher Verhältnisse von Algen zu Bakterien wurden auf die Sauerstoffverfügbarkeit im System, durch tägliche Erstellung der PI-Kurven, untersucht. Aus den sogenannten PI-Kurven wurden die Parameter Photosyntheseleistung (P_{max}), Respiration, Lichtsättigungspunkt (I_k) und Lichtkompensationspunkt (I_c) berechnet.

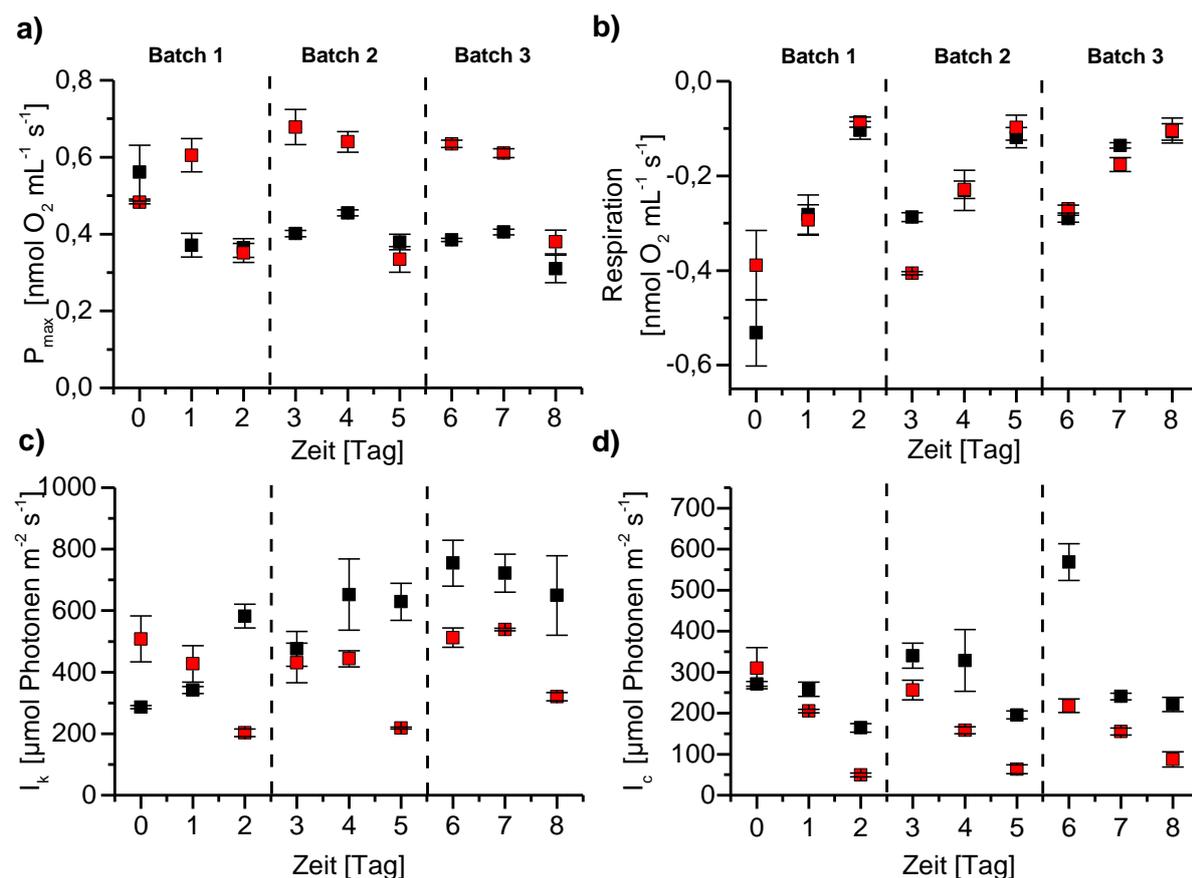


Abb. 36: Überblick der Verläufe aufgenommener PI-Parameter (P_{max} , Respiration, I_k (Lichtsättigungspunkt) und I_c (Lichtkompensationspunkt) unterschiedlich angesetzter Verhältnisse von Algen- zu Bakterienkonzentrationen über einen Zeitraum von 8 Tagen. Schwarz markierte Punkte zeigen die Verläufe vom Verhältnis 2 zu 1 (■) in schwarz und in rot 1,5 zu 1 (■). Nach ca. drei Tagen wurden neues Abwasser (synthetisches) zugeführt und in Batch Bereiche 1, 2, und 3 mit gestrichelten Linien eingeteilt. Die Daten entsprechen den Mittelwerten von drei Replikaten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

P_{max} gibt die maximale Photosyntheseleistung/Sauerstoffproduktion, die bei Lichtsättigung erreicht werden kann, an. Die maximale Photosyntheseleistung der ALBA-Flocken erreichten unterschiedliche Sauerstoffproduktionsraten in den drei Batchversuchen beim 2:1 Ansatz (Abb. 36a). Die Photosyntheseleistung des 2:1 Ansatzes lag in allen drei Batchversuchen im Bereich von ca. 0,4 nmol O₂ mL⁻¹ s⁻¹. Ein signifikant wiederkehrendes Bild von Batch 1 zu

Batch 2 und Batch 3 war in der Photosyntheseleistung im Ansatz 1,5:1. Die beiden ersten Tage eines Batchversuches erreichte das System Sauerstoffwerte von ca. $0,6 \text{ nmol O}_2 \text{ mL}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und sanken an den letzten Tagen auf $0,4 \text{ nmol O}_2 \text{ mL}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Der Ausmaß der Respiration verlief in beiden Ansätzen ähnlich (Abb. 36b). Ein kontinuierlicher Respirationsrückgang ist festzustellen. Die ersten Tage eines Batchversuches zeigten die höchsten Respirationen von ca. $-0,4 \text{ nmol O}_2 \text{ mL}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Bereits an den zweiten Tagen eines Batchversuches ergaben sich Werte von $-0,3$ bis $-0,2 \text{ nmol O}_2 \text{ mL}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und in den letzten Tagen lagen die Respirationen bei ca. $-0,1 \text{ nmol O}_2 \text{ mL}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Aus den einzelnen PI-Kurven wurden die Lichtsättigungspunkte berechnet. In Abb. 36c wurden die berechneten Lichtsättigungspunkte bezogen auf die einzelnen Tage dargestellt. Der Lichtsättigungspunkt gibt den Punkt an, ab dem die Photosyntheseleistung durch die Erhöhung der Lichtintensität nicht mehr deutlich gesteigert werden kann, sodass die Sauerstoffproduktionsrate einem konstanten Niveau zuläuft. Der Lichtsättigungspunkt des Ansatzes mit dem Verhältnis 2:1 verlief in jeden Batchversuch unterschiedlich. Jedoch stieg der Lichtsättigungspunkt über die drei Batchversuche zusammen an, ca. von 300 nach $700 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Im dritten Batch blieb der Lichtsättigungspunkt konstant. Beim 1,5:1 Ansatz sanken die Lichtsättigungspunkte. Dabei lagen die Lichtsättigungspunkte in den ersten Tagen eines Batchversuches meist bei $400\text{-}500 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ und in den letzten Tag etwas über $200 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Der Lichtkompensationspunkt (I_c) beschreibt die Lichtintensität, bei der die Photosyntheserate und die Respirationsrate ausgeglichen sind. Eine stetige Abnahme des Lichtkompensationspunktes im 2:1 Ansatz wurde in allen drei Batchversuchen gemessen (Abb. 36d). Nach der Zugabe von Nährstoffen erhöhte sich der I_c und sank in den darauffolgenden Tagen ab von ca. 300 auf ca. $150 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Im dritten Batch lag der I_c bei $550 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Der 1,5:1 Ansatz begann mit einem Lichtkompensationspunkt von $300 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ und lag an den letzten Tagen bei ca. $50 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Eine Ausnahme ist im dritten Batch zu sehen, dort lag der Lichtkompensationspunkt am dritten Tag bei ca. $100 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Erstmals war es möglich während des Versuchs die Konzentration der Algen und Bakterien photometrisch zu bestimmen. Täglich wurden drei Probe entnommen und von jeder Probe wurden drei Replikate gemessen. Zusätzlich wurde der Trockensubstanzgehalt bestimmt. Mittels des programmierten MATLAB-Modells (Koeffizientenmatrix 1) konnten nun die Konzentrationen an Algen und Bakterien berechnet werden. Zum einen berechnet das Programm mittels der aufgenommenen Extinktionsspektren das Verhältnis Alge zu Bakterien und zum anderen die TS-Anteile beider Komponenten mit Hilfe der gewogenen Gesamttrockenbiomasse.

Die Änderungen der berechneten Trockensubstanzmenge der Ansätze 2:1 und 1,5:1 wurde in Abb. 37 a und c dargestellt.

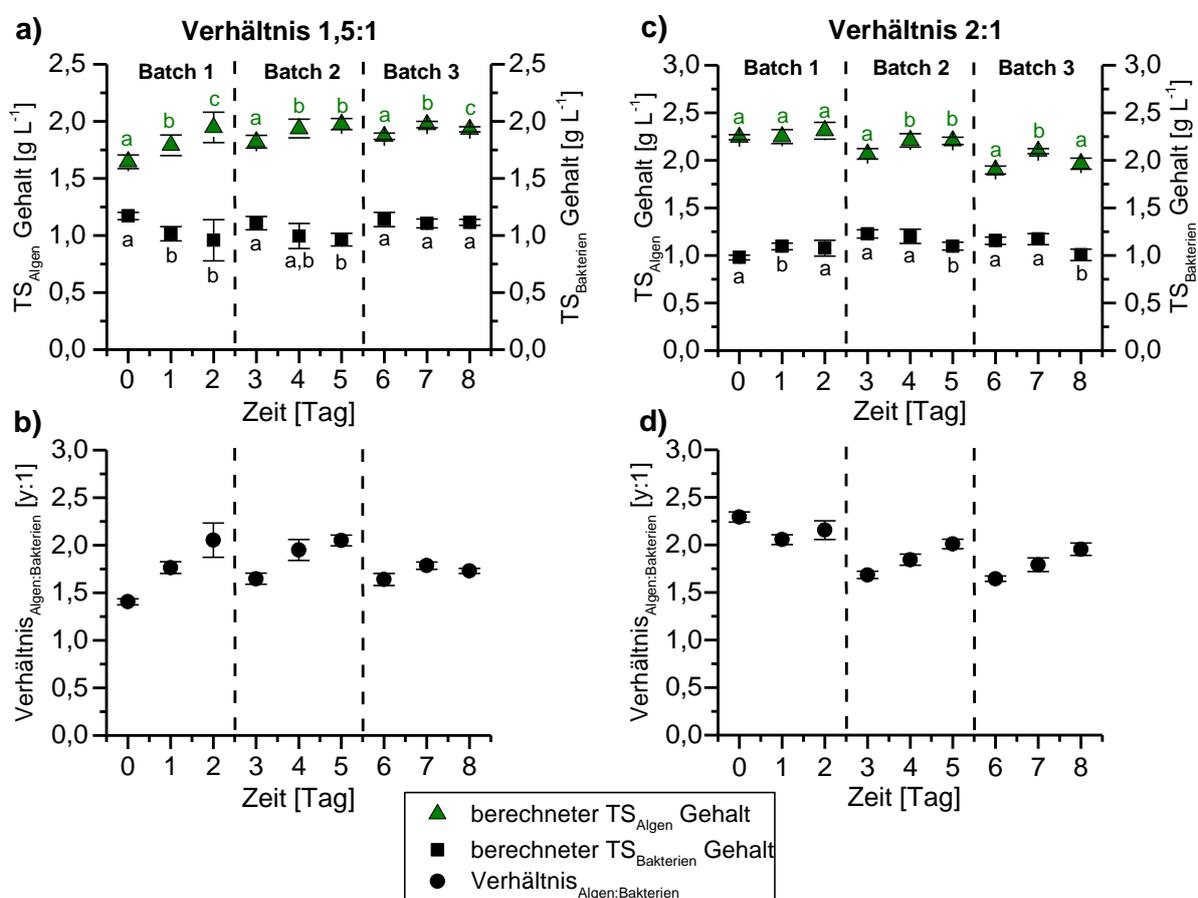


Abb. 37: Berechnete Verhältnisse von Algen und Bakterienkonzentration beider Versuchsansätze 2:1 und 1,5:1. Dargestellt ist der berechnete Trockensubstanzgehalt der Algen und Bakterien (a und c) und die Entwicklung des Verhältnisses Algen zu Bakterien über den gesamten Versuchszeitraum von 9 Tagen (b und d)³. Für die Berechnung wurde die Koeffizientenmatrix 1 angewendet. Nach ca. drei Tagen wurde neues Abwasser (Nährstofflösung) zugeführt und in Batch Bereiche 1, 2, und 3 mit gestrichelten Linien eingeteilt. Die Daten entsprechen den Mittelwerten von drei Replikaten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die TS_{Algen} und $TS_{\text{Bakterien}}$ wurde innerhalb der Tage eines Batches auf signifikante Unterschied ($p < 0,01$) untersucht.

Der TS-Gehalt der Algen nimmt beim Ansatz 1,5:1 zwischen den Tagen, an denen keine Nährstoffe hinzugefügt wurden, zu. Im Gegensatz dazu wurde der TS-Gehalt der Bakterien an diesen Tagen etwas geringer. Nach der Zugabe der Nährstoffe zeigte sich das gegenteilige Verhalten: Abnahme der Algenbiomasse und Zunahme der Bakterienbiomasse. Die Verdünnung durch die Nährstoffzugabe wurde bereits rausgerechnet, trotzdem wurde

³ Diese Daten wurden aus der Bachelorarbeit von Timo Steinbrecher verwendet.

ein Zunahme gemessen, denn zwischen Tag 2 und Tag 3 hätte die Algenkonzentration allein durch die Verdünnung von $1,95 \text{ g L}^{-1}$ auf $1,77 \text{ g L}^{-1}$ sinken müssen. Tatsächlich sank sie aber nur auf $1,82 \text{ g L}^{-1}$. Das bedeutet, dass die Algen trotz des Rückgangs des TS-Gehaltes um etwa $0,05 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ gewachsen sind. Die Bakterienbiomasse, die bis Tag 2 noch rückläufig war, nahm wesentlich schneller zu, nämlich um etwa $0,24 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$. In Abb. 37b wurden die Verhältnisse Algen zu Bakterien des 1,5:1 Ansatzes über den gesamten Versuchszeitraum von 9 Tagen dargestellt. Hierbei fiel der Anstieg der Algenkonzentration in den einzelnen Batchversuchen auf. Somit verschob sich das Verhältnis auf mehr Algenanteil. Nach der Zugabe der Nährstoffe wurde eine Abnahme der Algenkonzentration berechnet. Das ALBA-Zahlenverhältnis lag durchschnittlich zu Beginn der Batchversuche 1 und 2 bei 1,5 zu 1 und stieg am dritten Tag auf 2 zu 1 an. Ausnahme bildete der dritte Batch, dort wurde ein ALBA-Verhältnis von maximal 1,7 zu 1 gemessen.

Bei dem 2 zu 1 Ansatz wurde ein konstanter TS-Gehalt der Algen, als auch der Bakterien berechnet (Abb. 37c). Betrachtet auf den kompletten Versuch nahm die Algenbiomasse tendenziell ab von etwa $2,3 \text{ g L}^{-1}$ auf etwa $1,7 \text{ g L}^{-1}$. Wobei der TS-Gehalt stets nach den Nährstoffzugaben abnahm.

In Abb. 37d wurde das berechnete Verhältnisse des 2:1 Ansatzes dargestellt. In den drei Batchversuchen verringerte sich die Algenkonzentration nach der Nährstoffzugabe. Im Gegensatz dazu ist eine Zunahme der Algenkonzentration zwischen den Tagen ohne Nährstoffzugabe zu detektieren. (außer zwischen Tag 1 und 2). Das ALBA-Verhältnis sinkt im ersten Batch von 2,3:1 auf ca. 2:1. In den folgenden Batchversuchen (2 und 3) steigt das ALBA-Zahlenverhältnis von durchschnittlich 1,6:1 zum Versuchsbeginn auf ca. 2:1 zum Versuchsende.

4.5 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Algen-Bakterien-Flocken aus der Abwasserreinigung hinsichtlich ihrer Morphologie näher untersucht. Mit der rasterelektronenmikroskopischen Technik wurden Strukturfeinheiten der Flockenoberflächen sichtbar gemacht. Hierfür wurde eine Probe aus dem Bioreaktor entnommen und für das Rasterelektronenmikroskop vorbereitet (vgl. 3.11).

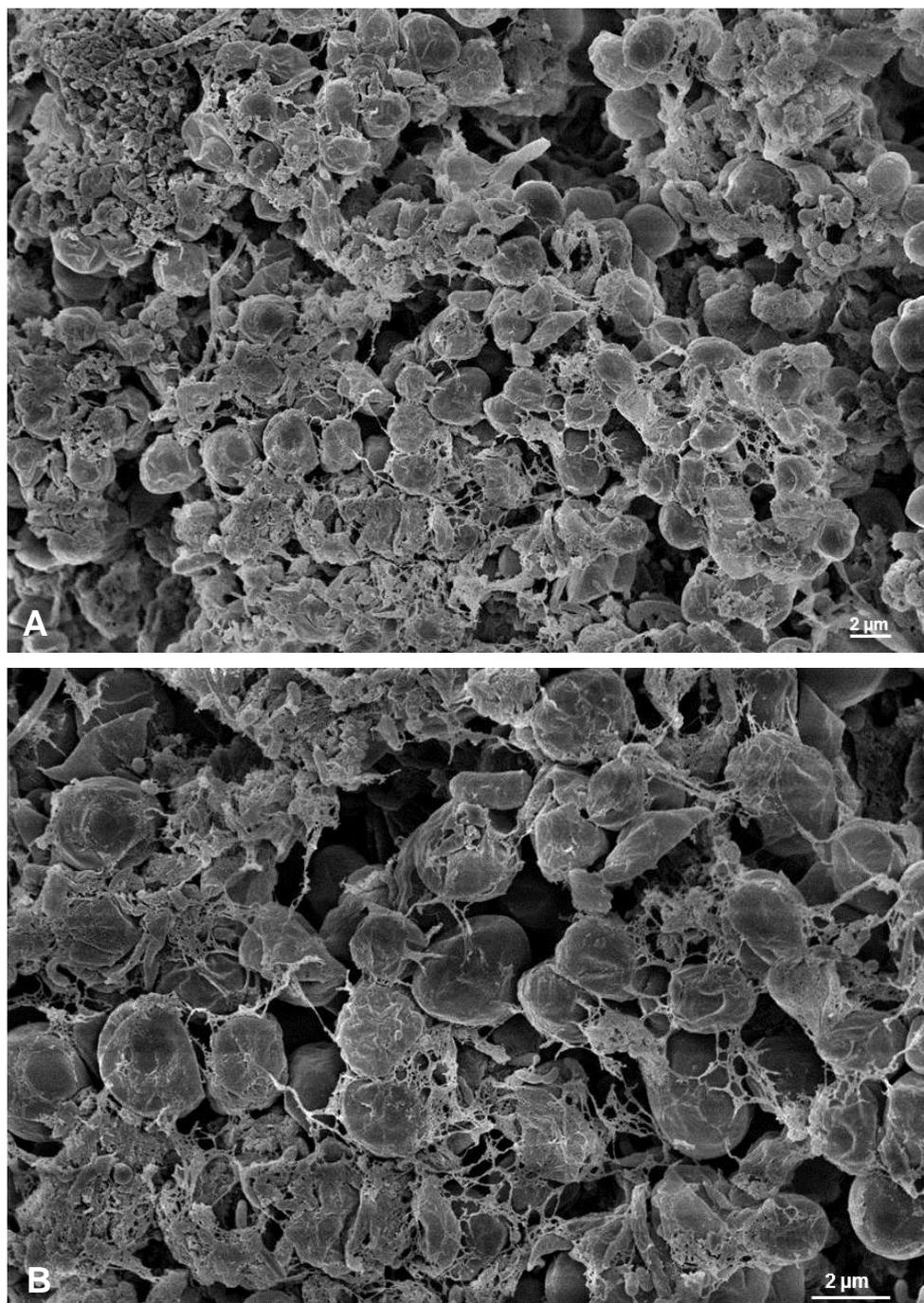


Abb. 38: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der vielschichtige und verflochtene Struktur der ALBA-Flocken (a und b). Der Größenmaßstab von 2 µm ist in der Abbildung enthalten (REM LEO 1525, 5.00 kV).

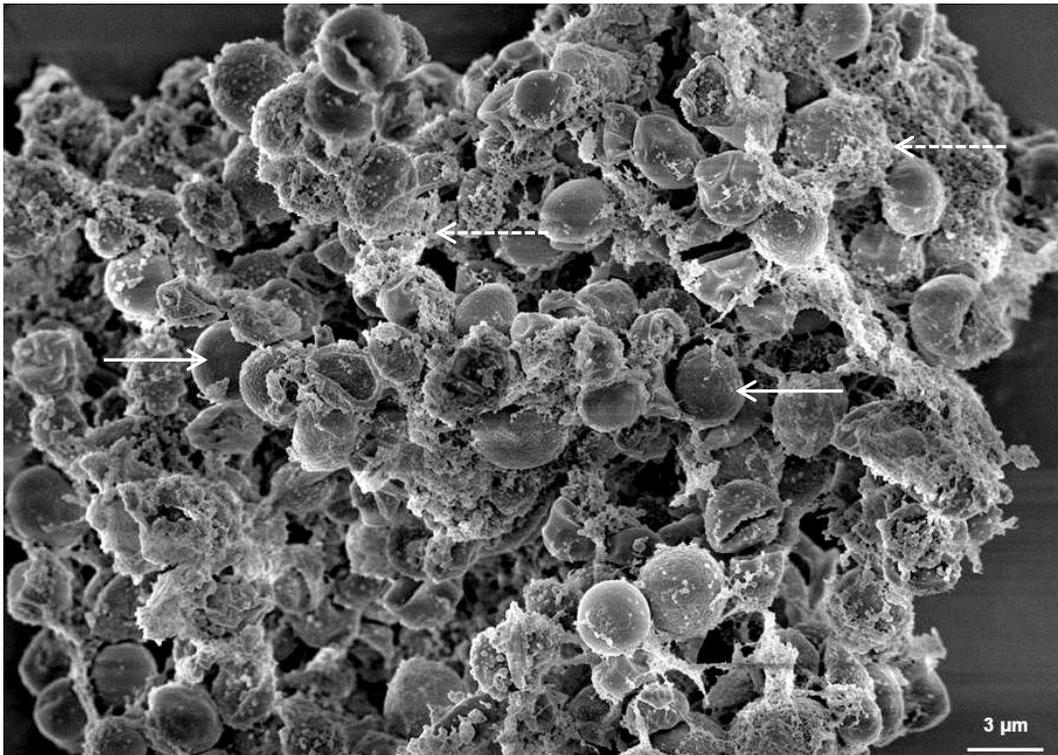


Abb. 39: Rasterelektronenmikroskopischer Überblick von kompakten Algen-Bakterien-Flocken während der Abwasserreinigung. Der Größenmaßstab von 3 μm ist in der Abbildung enthalten (REM LEO 1525, 5.00 kV). Die Pfeile zeigen auf die kugelförmigen *Chlorella* Zellen. Die gestrichenen Pfeile weisen auf das EPS Netzwerk hin.

In den Rasterelektronenmikroskopischen Abb. 38 a, b und Abb. 39 ist die vielschichtige und verflochtene Struktur der kompakten ALBA-Flocken sichtbar. Mit Hilfe von extrapolymeren Substanzen ist ein stabiles Netzwerk aus Mikroalgen und Bakterien ausgebildet.

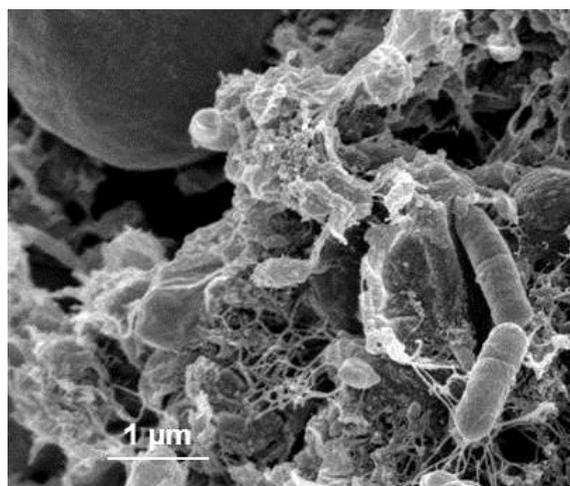


Abb. 40: Rasterelektronische Nahaufnahme von Algen-Bakterien Flocken aus der Abwasserreinigung. Der Größenmaßstab von 1 μm ist in der Abbildung enthalten (REM LEO 1525, 5.00 kV).

Mittels der Nahaufnahmen (Abb. 40) der ALBA-Flocken ist die Komplexität des Netzwerks aus Mikroalgen, Bakterien und extrapolymere Substanzen verdeutlicht. Die Kollektivität beider Komponenten Mikroalgen und Bakterien wird durch die EPS verstärkt. Insgesamt sind nur stäbchenförmige Bakterien zu sehen.

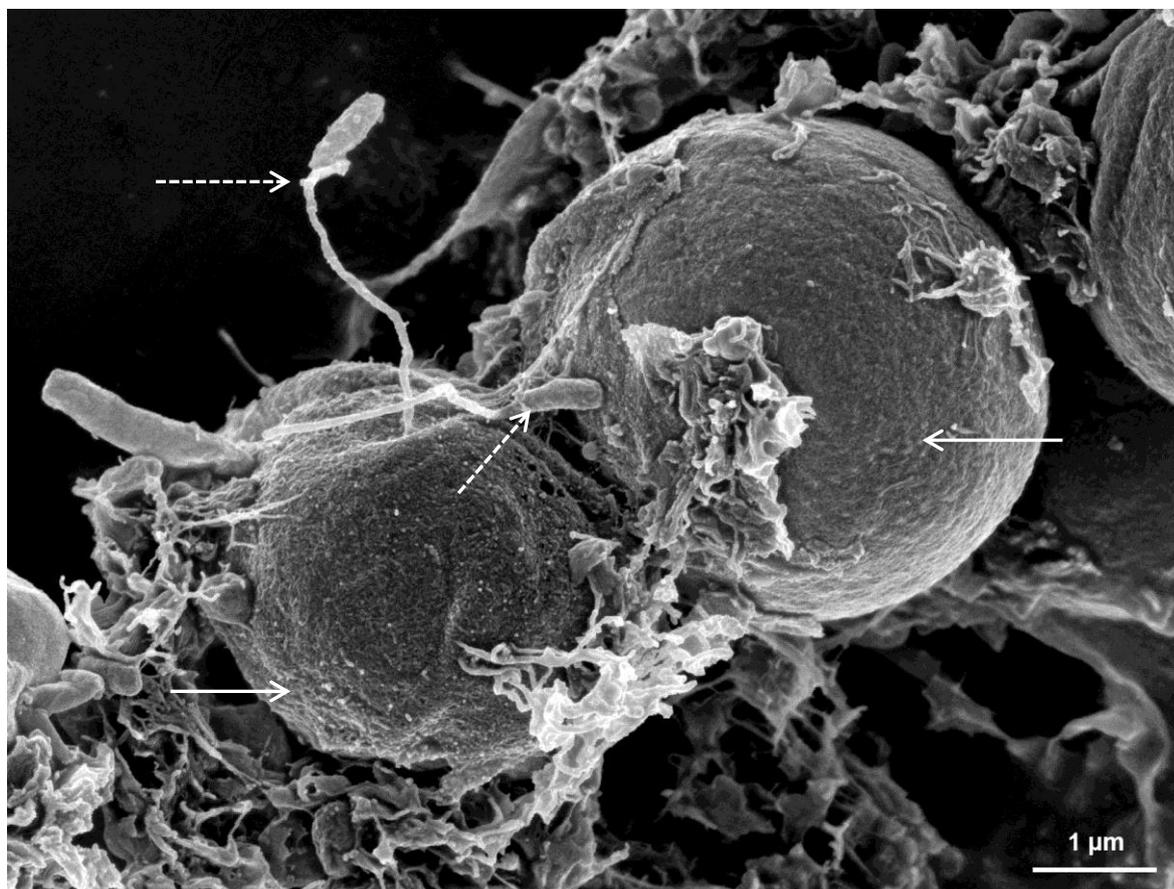


Abb. 41: Rasterelektronische Nahaufnahme von Algen-Bakterien-Flocken aus der Abwasserreinigung. Der Größenmaßstab von 1 µm ist in der Abbildung enthalten (REM LEO 1525, 5.00 kV). Die Pfeile zeigen auf die kugelförmigen *Chlorella* Zellen. Die gestrichelten Pfeile weisen auf stäbchenförmige Bakterien mit Fortsätzen hin.

In Abb. 41 ist die Morphologie der Mikroalge *Chlorella vulgaris* als kugelförmig Zelle mit einem Durchmesser von ca. 3-4 µm dargestellt. Bakterien-Zellen dagegen weisen eine stäbchenförmige Morphologie auf und haben eine Länge von ca. 600 nm und einen Durchmesser von ca. 260 nm. Außerdem besaßen einige Bakterien einen Fortsatz von ca. 2,5 µm Länge.

5. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Interaktionen zwischen verschiedenen Mikroorganismengruppen in so genannten Biofilmflocken im Detail zu untersuchen und damit einen Beitrag zur Optimierung der Prozesssteuerung von Kläranlagen zu leisten. Der Schwerpunkt lag dabei auf dem Zusammenwirken von Algen und Bakterien. Die Arbeiten erfolgten auf physiologischer und molekularbiologischer Ebene und umfassten zudem die Entwicklung und Etablierung von neuen Methoden zur Quantifizierung der Populationen in Algen-Bakterien (ALBA) Flocken.

Bei der Abwasserreinigung mit Mikroalgen wird das Abwasser in drei Haupttypen eingeteilt: in kommunales, landwirtschaftliches und industrielles. Hinzu kommt, dass das industrielle Abwasser in der Zusammensetzung des Schlammes, der organischen und anorganischen Nährstoffe, der Toxine und der pathogenen Organismen je nach Abwasserherkunft wie z.B. von Brauereien, Papierfabriken oder Lebensmittelherstellung unterschiedlich ist. So muss zunächst im Labormaßstab die Tauglichkeit des Abwassers zur Reinigung mit Mikroalgen untersucht werden. Für das Mikroalgenwachstum sind vor allem die Elemente Stickstoff und Phosphor im Abwasser erforderlich. Während Phosphor in der Natur ausschließlich in Form von Phosphat vorkommt, kann Stickstoff als Ammoniak, Nitrit, Nitrat oder Harnstoff bzw. organisch gebunden vorkommen. Die Stickstoff- und Phosphatkonzentration unterscheidet sich ebenfalls erheblich je nach Abwassertyp (siehe Vergleichstabelle Chiu et al. (2015)). Bei Zellstoff- bzw. Papierabwasseranlagen herrscht meist Stickstoff- und Phosphormangel, sodass eine biologische Reinigung ohne Zusatz von ergänzenden Nährstoffen, wie z.B. Harnstoff und Phosphorsäure nicht möglich ist (Slade et al., 2004).

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf den physiologischen Abbaucharakteristika des Papierfabrikabwassers mittels ALBA-Flocken. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Laborversuche diskutiert und anschließend die Ergebnisse der Pilotanlagen betrachtet.

Im Labormaßstab (2 L Reaktor) wurde eine Reinigungskapazität des Papierfabrikabwassers mittels Algen-Bakterien-Flocken mit einer durchschnittlichen CSB-Abbauleistung von 76% erzielt. Trotz der niedrigen Stickstoff- und Phosphatkonzentrationen im Zulauf, variierte der Trockensubstanzgehalt der Flocken im Reaktor nur geringfügig über die vier Batch-Versuche. Dies deutet auf einen optimalen TS-Gehalt bei den bestehenden Lichtverhältnissen hin, da weder Zunahme noch Abnahme der Biomasse zu erkennen war. Der Phosphatgehalt sank im Laufe des Batchversuchs. Im Laborversuch gab es keine zusätzliche Zugabe von Nährstoffen.

Im Rahmen der Untersuchungen stellte sich heraus, dass die Bestimmung der Lebendzellzahl der heterotrophen Bakterien durch die Kultivierung auf Agarplatten nicht empfehlenswert ist, da die gleichmäßige Verteilung durch die Bildung enger Gemeinschaften aus Algen und Bakterien erschwert wurde.

Die durchschnittliche Reinigungskapazität des Papierfabrikabwassers mittels Algen-Bakterien-Flocken in beiden Pilotanlagen lag bei einer durchschnittlichen CSB-Abbauleistung von 84%, wobei die Verweildauer des Abwassers im 0,5 m hohen Reaktor $4,01 \pm 2,2$ Tage betrug und im 1 m hohen Reaktor $7,74 \pm 2,42$ Tage. Der Zulauf des Abwassers zeichnete sich durch einen geringen Stickstoff- und Phosphatgehalt aus. Um einer Unterversorgung der ALBA-Biomasse (speziell der Mikroalgen) entgegenzukommen, wurde eine Nährstoffdosierung mit einem C:N:P-Verhältnis 100:5:1 eingestellt.

Der Chlorophyllgehalt in der ALBA-Biomasse des 800 L Reaktors war doppelt so hoch (ca. $15-20 \mu\text{g mL}^{-1}$) als die des 1600 L-Reaktors, dies erklärt die kürzere Verweildauer des Abwassers in diesem Reaktor. Somit wurde mehr Sauerstoff produziert und die Bakterien konnten die organischen Bestandteile im Abwasser schneller verstoffwechseln. Die ebenfalls höheren durchschnittlichen Trockensubstanzwerte (Reaktor_{800L} $1,65 \pm 0,21 \text{ g L}^{-1}$; Reaktor_{1600L} $1,22 \pm 0,18 \text{ g L}^{-1}$) des kleineren Reaktors wiesen auf einen höheren Algenanteil hin.

Weil die Ergebnisse der Chlorophyllmessungen im Nachklärbecken beider Reaktoren nach einer Woche auf einen konstanten Wert von $0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ sanken, kann auf eine Vergesellschaftung der freien Mikroalgen in den Belebtschlamm geschlossen werden.

Die Studien von Tarlan et al. (2002) erzielten bei ausschließlichem Einsatz von Mikroalgen bei der Reinigung von Zellstoff- und Papierindustrieabwässern einen CSB-Abbaugrad von 55-60% nach einer 42-tägigen Betriebsperiode. Ergebnisse der Untersuchungen von Usha et al. (2016) ergaben sogar einen CSB-Abbaugrad von 75% nach 28 Tagen.

Etwa 90% des Abwassers aus Zellstoff- und Papierfabriken werden hauptsächlich vollbiologisch entweder in einer innerbetrieblichen, kommunalen oder Verbandskläranlage gereinigt. Dabei betreiben die Unternehmen sowohl eine aerobe (ein- oder mehrstufig) als auch eine anaerobe Stufe (Jung et al., 2014). Bei einer aeroben Behandlung von Zellstoff- und Papierindustrieabwasser mit einem C:N:P-Verhältnis von etwa 170:5:1,5 wurden mehr als 75% der organischen Substanzen (gemessen durch den CSB) im Abwasser entfernt (Ammary, 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Reinigungsverfahren der vorher zitierten Autoren miteinander kombiniert, indem Mikroalgen und Belebtschlamm (Bakterien) in ein TS-Verhältnis von 2:1 gesetzt worden sind.

Unterschiedliche Prozesse bei der Zellstoff- und Papierverarbeitung führen zu täglichen Änderungen der Zusammensetzung des Abwassers (Ashrafi et al., 2015).

Für den Labormaßstab wurde lediglich zu einem einzigen Prozesszeitpunkt 10 L Abwasser entnommen und für die Batch-Versuche verwendet. So konnten im 2 L-Reaktor die organischen Bestandteile des Papierfabrikabwassers bis zu 76% innerhalb von 3 Tagen –ohne Zugabe von Nährstoffen– reduziert werden.

Dagegen wurde für den Pilotmaßstab das Abwasser direkt von der Papierfabrik nach der ersten biologischen Stufe des MBBRs (moving bed biofilm reactor) zugeführt. Bei der Interpretation der Ergebnisse ist daher zu berücksichtigen, dass durch Papierprozesse wie z.B. die Umstellung von Altpapier auf Weißkarton als Rohstoff sich ebenfalls die Zusammensetzung des Abwassers ändert.

In den Pilotanlagen lag die N- und P-Konzentration des Abwassers deutlich niedriger als in den Laborversuchen, daher wurde eine Nährstoffzudosierung eingestellt. Die durchschnittliche Abbaurate der organischen Stoffe, die durch den CSB-Gehalt ausgedrückt wird, betrug bei beiden Pilotreaktoren 84%.

Su et al. (2011) berichten von CSB-Abbaukapazitäten von $98,2 \pm 1,3\%$ nach 8 Tagen bei der Reinigung von kommunalem Abwasser beim Einsatz von Mikroalgen und Belebtschlamm.

Studien zu Biomasse und Inhaltstoffen von Mikroalgen standen in den vergangenen Jahren zunehmend im Mittelpunkt des Interesses, vor allem als natürliche Ressource im Einsatz bei Lebens- und Arzneimitteln, Tierfutter und Biokraftstoffen. Dabei scheiden Mikroalgen auch verschiedene extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) in ihre unmittelbare Umgebung aus. Obwohl die Anzahl der hierzu erfolgten Studien noch vergleichsweise gering ist, ist der Einsatz von Biopolymeren in den Bereichen Medizin, Biomedizin, Lebensmittel, Maschinenbau und Abwasserbehandlung bereits weit fortgeschritten. Die produzierte EPS von *C. vulgaris* weist zum Einen antibakterielle Eigenschaften auf und zum Anderen trägt sie in der Abwasserbehandlung zur Flockenbildung bei (Manheim & Nelson, 2013; Noda et al., 1996).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein kombiniertes Reinigungssystem aus Mikroalgen und Bakterien untersucht, dass sich durch eine hohe Wechselwirkung auszeichnet. Das koordinierte Zusammenwirken zwischen verschiedenen Mikroorganismen ist in der Natur eher die Regel als die Ausnahme. Häufig erfolgen solche Interaktionen innerhalb einer von den Mikroorganismen produzierten extrazellulären polymeren Matrix, so genannten Biofilmen oder Flocken. Letztere bilden sich an Gewässerschwebstoffen und können als mobile Variante eines Biofilms angesehen werden. EPS können sowohl von Archaeen, Bakterien und Eukaryoten produziert werden (Flemming et al., 2007). Die Matrix besteht aus

Exopolysacchariden (Sutherland, 2001), DNA (Whitchurch et al., 2002) sowie Proteinen und Lipiden (Wingender et al., 2001). Die mechanische Stabilität von Biofilmen ist dabei abhängig von der Zusammensetzung der EPS (Flemming & Wingender, 2010). So wird unter anderem den neutralen und sauren Polysacchariden sowie den Proteinen die mechanische Stabilität von Biofilmen zugeschrieben (Flemming & Wingender, 2010).

Um Rückschlüsse auf die Flockenstabilität der ALBA-Flocken machen zu können, wurde die Zusammensetzung der EPS der ALBA-Flocken sowohl in der Laboranlage, als auch in den Pilotanlagen untersucht.

Die Ergebnisse der einzelnen EPS-Komponenten ergaben, dass die Zusammensetzung der einzelnen EPS-Komponenten in allen drei Untersuchungsanlagen ähnlich war. Die EPS bestand aus einem hohen Lipidgehalt und einer gleichen Menge an Proteinen und sauren Polysacchariden. Nur eine geringe Menge an neutralen Polysacchariden wurde detektiert (siehe Tab. 16).

Tab. 16: Zusammenfassende Übersicht über die Mengenverteilung der gemessenen EPS-Komponenten im 2 L-Reaktor, 800 L- und 1600 L-Pilotanlage. (Mittelwerte über die Versuchsdauer \pm SD; Beim 2 L-Reaktor n=12, beide Pilotanlagen n=15).

EPS-Komponente mg g ⁻¹ ALBA-Biomasse	Reaktor _{2L}	Reaktor _{1600L}	Reaktor _{800L}
Lipide	17,52 \pm 12,72	14,14 \pm 7,84	17,19 \pm 8,56
saure Polysaccharide	2,25 \pm 0,5	0,83 \pm 0,18	1,17 \pm 0,40
neutrale Polysaccharide	1,09 \pm 0,28	0,38 \pm 0,09	0,54 \pm 0,17
Proteine	2,22 \pm 0,22	1,42 \pm 0,47	1,93 \pm 0,57

Krohn-Molt et al. (2013) analysierten die EPS-Komponenten des gebildeten Biofilms auf der Reaktoroberfläche bei der Kultivierung von *A. obliquus* in einem Flat Panel PBR. Die Zusammensetzung der EPS bestand aus Lipiden (10,4 mg g⁻¹) sauren (8,2 mg g⁻¹) und neutralen (3,4 mg g⁻¹) Polysacchariden und Proteinen (3,8 mg g⁻¹).

Zwar war der Anteil an sauren, neutralen Polysacchariden und Proteinen in den vorliegenden Untersuchungen geringer, allerdings waren die Mittelwerte der einzelnen Komponenten durch eine niedrige Standardabweichung über den gesamten Versuchszeitraum gezeichnet, weshalb auf eine fortlaufende Stabilität der Flocken geschlossen wurde.

Eine mögliche Ursache für die niedrigeren Werte könnte in der Form des Biofilms liegen. So lagen die Mikroalgen und Bakterien in so genannten ALBA-Flocken vor und wurden durch ein Rührwerk im Reaktor durchmischt. Der Biofilm, der von Krohn-Molt et al. (2013) untersucht wurde, setzte sich an der Reaktoroberfläche fest und wurde für die Analysen abgeschabt. Folglich wären andere/höhere Mengen an bestimmten EPS-Komponenten

erforderlich, um an der Reaktoroberfläche haften zu bleiben. Außerdem erschwert die unterschiedliche Handhabung bei der EPS-Isolierung gegebenenfalls die Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Studien. Denn die Biofilmaggregate sind in unterschiedlichen Habitaten zu finden, wie zum Beispiel in Böden, Sedimenten, Belebtschlammern, aquatischen Standorten oder Algen-Bakterien-Biofilmen. Daher werden verschiedene Methoden zur Isolierung der EPS benötigt. Hierzu zählen Behandlungen mit Ultraschall, EDTA, NaCl, Formaldehyd bzw. Formaldehyd mit NaOH (Comte et al., 2006; Dignac et al., 1998; Liu & Fang, 2002; Wingender et al., 2001). Die Untersuchungen von Pan et al. (2010) ergaben stark variierende Ausbeutemengen der EPS aus Algen-Bakterien-Biofilmen durch fünf unterschiedliche EPS-Extraktionsmethoden. Nicht nur die Wahl der EPS Extraktionsmethode, sondern auch die Wahl der Analyse zur quantitativen Bestimmung der EPS-Komponenten, ist ein entscheidender Faktor für die Ausbeutemenge der EPS.

In der Literatur werden den Polysacchariden in der EPS-Matrix strukturelle Eigenschaften zugeschrieben (Flemming & Wingender, 2002). Untersuchungen von Ma et al. (2006) zeigten bei einer Überproduktion des Psl-Polysaccharids, verbesserte Zelloberflächen- und interzellulären Adhäsion von *P. aeruginosa*. Des weiteren vermuteten Flemming & Wingender (2002), dass auch die Proteine Strukturfunktionen übernehmen, z. B. wenn sie mit Vernetzungsstellen von Polysaccharidsträngen assoziieren. Die Biofilm-Zusammensetzung des Belebtschlammes von Frølund et al. (1996) bestand hauptsächlich aus Proteinen (46 - 52%), Huminsäureverbindungen (18 - 23%) und Kohlenhydraten (17%).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Lipidgehalt der EPS durch Extraktion und anschließende Gravimetrie bestimmt (Hara & Radin, 1978). So wurden in allen drei Versuchsansätzen dieser Arbeit, Lipide in den ALBA-Flocken als EPS-Hauptbestandteil nachgewiesen. Da Mikroalgen Lipide produzieren und in ihre Zellstruktur einlagern, ist der hohe Anteil an Lipiden in der EPS nicht verwunderlich. Bei den meisten Mikroalgen liegt der Lipidanteil zwischen 20 und 50% ihrer gesamten Biomasse (Brennan & Owende, 2010; Chisti, 2007). *C. vulgaris* hat einen Lipidanteil von etwa 21% (Trockengewicht) unter optimierten Bedingungen und bis zu 40% (Trockengewicht) bei Stress (Bhola et al., 2011). Ein Grund für die starke Änderung des Lipidgehaltes in der EPS im Verlauf des Versuchszeitraums könnte durch Lipidfreisetzung in die Umgebung durch Zelllyse bedingt sein. Die komplexe Struktur der ALBA-Flocken könnte ebenfalls dazu beitragen, dass vereinzelt Lipidanteile nicht ins Medium freigesetzt werden, sondern in der EPS der Flocken zurückgehalten werden. Zusätzlich sind die Ergebnisse bezüglich der Lipidgehalte durch eine hohe Standardabweichung gekennzeichnet. Dies könnte man auf die hohe Biodiversität der ALBA-Flocken zurückführen, denn jede ALBA-Flocke kann als eine selbständige

Mikroumgebung angesehen werden. Somit unterliegt jede Flocke unterschiedlichen Wechselwirkungen.

Biofilme haben einen erheblich hohen Gehalt an extrazellulären polymeren Substanzen. Durch ihre Fähigkeit, mit anderen Polysacchariden, Makromolekülen und Zellen, sowie mit Ionen und gelösten Stoffen, in Wechselwirkung zu treten, ist eine Vielzahl von Mikroumgebungen innerhalb eines Biofilms vorhanden (Sutherland, 2001).

Letztendlich ist die Menge sowie die Zusammensetzung von gebildeten EPS durch abiotische und biotische Faktoren beeinflusst, wie z.B. die Zusammensetzung der Arten, dem Alter der Kultur, der Verfügbarkeit von Nährstoffen, der Bedingung der Kultivierung, die Form des Reaktors oder sogar Toxizität im Umfeld. In den vergangenen 10 Jahren wurden die Komponenten wie Exopolysaccharide und Proteine ausführlicher untersucht als die Lipide und Nukleinsäure, sodass über letztere weniger Informationen vorliegen (Xiao & Zheng, 2016).

In der vorliegenden Arbeit wurden mikrobielle Populationsanalysen in einem ALBA-Reinigungssystem untersucht. Diese Analysen sollten detaillierte Kenntnisse zur Veränderung der ALBA-Biozönose über die Zeit liefern. Insbesondere sollte geklärt werden, ob sich die mikrobielle Lebensgemeinschaft über einen längeren Zeitraum stabilisiert. Bislang durchgeführte Populationsanalysen bezogen sich auf die räumliche Betrachtung. Um die Zusammensetzung komplexer mikrobieller Lebensgemeinschaften besser zu verstehen, werden seit Jahrzehnten molekularbiologische Techniken weiterentwickelt. Dazu gehören unter anderem die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH), die Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE) und die Hochdurchsatzsequenzierung. In dieser Arbeit wurde mittels DGGE die bakterielle und eukaryotische Lebensgemeinschaft der ALBA-Flocken über einen Zeitraum von 15 Wochen in beiden Pilotanlagen untersucht. Insgesamt sollte geklärt werden, ob sich ein stabiles Konsortium aus Mikroalgen und Bakterien innerhalb dieses Zeitraums bilden kann.

Ursprünglich wurde das DGGE-Verfahren entwickelt, um DNA auf Mutationen zu detektieren (Fischer & Lerman, 1983). Seitdem Muyzer et al. (1993) diese Methode für Analyse von mikrobiellen Gemeinschaften aus Umweltproben angewendet hat, wurde es häufig gebraucht. Insbesondere ermöglicht eine DGGE-Analyse eine gute Vergleichbarkeit einer Vielzahl von Proben bezüglich räumlicher und zeitlicher Unterschiede. Auf diese Weise bekommt man einen schnellen Überblick über die Veränderungen der Zusammensetzung einer mikrobiellen Gemeinschaft. Außerdem besteht die Möglichkeit, durch eine Sequenzierung repräsentativer DNA-Fragmente die mikrobielle Zusammensetzung zu interpretieren. Obwohl die DGGE viele Vorteile hat, hat sie jedoch auch ihre Grenzen.

Die Vergleichbarkeit von Ergebnissen von einem zum anderen Labor wird durch eine Vielzahl von Faktoren wie z.B. durch die DNA-Isolierungsmethode, die Wahl der Oligonukleotide, die PCR-Bedingungen, Unterschiede in der Herstellung des Gels, Färbungstechnik und photographische Methoden erschwert (Simpson et al., 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurden die von Muyzer et al. (1995) entwickelten universellen Primer für die bakterielle Diversitätsanalyse eingesetzt. Das mittels dieser Primer amplifizierte DNA-Fragment gilt mit etwa 550 bp als kurz genug, um gut aufgetrennt zu werden und lang genug, um zu einer zuverlässigen phylogenetischen Zuordnung zu kommen (Lessa & Applebaum, 1993). Für die eukaryotische Diversität wurden die Primer, die speziell für die genetische Diversität von eukaryotischen Mikroorganismen in aquatischen Umgebungen entwickelt wurden, verwendet (van Hannen et al., 1998).

Die Schärfe der Auftrennung von DNA-Fragmenten wird durch die unterschiedliche Zusammensetzung des Gradienten festgelegt. So können eng beieinander liegende DNA-Fragmente nicht voneinander getrennt werden und als eine einzige Bande erscheinen. Sekiguchi et al. (2001) untersuchten das Phänomen, dass zwei unterschiedliche DNA-Sequenzen als eine Bande auf dem Gel erscheinen. Ursache hierfür wurden in der PCR-Reaktion und den Sequenzierungsschritten gesehen. Kusar & Avgustin (2012) entwickelten eine Prozedur zur Vermeidung von störenden DNA-Artefakten.

Ein enger Denaturierungsgradient kann zum Ausschluss von DNA-Fragmenten führen und somit zur Unterschätzung der Diversität. Sun et al. (2013) berichten von intragenomischen Heterogenität der 16S-rRNA, die zur Überschätzung der Diversität führen. Dieses Phänomen tritt häufig in der V1- und V6-Region des 16S-rRNA-Gens auf. Bereits Muyzer & Smalla (1998) und Nubel et al. (1996) beschrieben die Sequenzheterogenität, die zu einer Überschätzung der tatsächlich anwesenden Bakterienanzahl innerhalb natürlicher Gemeinschaften führen kann. So kann ein Organismus aufgrund des Besitzes mehrerer heterogener rRNA-Operons mehr als ein DNA-Fragment im DGGE-Gel produzieren (Nubel et al., 1996). Bei der Durchführung von „nested“-PCR kann es zur verstärkten Abundanz bevorzugter Amplifikationen kommen (Suzuki & Giovannoni, 1996). Die Anzahl und Intensität der DNA-Fragmentbanden in einem DGGE-Gel gibt nicht unbedingt ein genaues Bild von der Anzahl und Häufigkeit der entsprechenden Spezies innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaft. Aufgrund der oben genannten Mängel sollten die Intensität und die Anzahl der DNA-Fragmente in einem DGGE-Gel nur als Indikation und nicht als absolutes Maß für den Grad der Diversität in einer Gemeinschaft interpretiert werden (Boon et al., 2002).

Die Ergebnisse des bakteriellen DGGE-Profiles beider Pilotanlagen zeigten, dass in den ersten fünf Wochen eine hohe Diversität und eine stabile phylogenetische Struktur in den Reaktoren vorlagen. Anschließend formierte sich die Zusammensetzung der Bakterienarten

neu. Von diesem Zeitpunkt an war eine geringfügige Abnahme der Diversität bis zum Versuchsende erkennbar.

Die Zusammensetzung der Mikroorganismen in den Pilotanlagen ist von zeitlichen Veränderungen der Umgebungsbedingungen abhängig. Sie werden von unterschiedlichen Faktoren, wie der Licht- und Nährstoffverfügbarkeit im Abwasser oder auch durch Temperaturschwankungen erheblich beeinflusst.

Die Zusammensetzung des Abwassers variierte innerhalb des untersuchten Zeitraums. So lag der Sulfatgehalt in den Wochen 1-4 durchschnittlich bei $49,65 \pm 12 \text{ mg L}^{-1}$, in den Wochen 5-9 lediglich bei durchschnittlich $27,7 \pm 16 \text{ mg L}^{-1}$ und in den darauffolgenden Wochen 10-15 bei einem Wert von durchschnittlich $48 \pm 24,5 \text{ mg L}^{-1}$. Erwähnt werden muss außerdem, dass die Zudosierung mit Harnstoff in den Wochen 4-9 und Phosphat bis zur 11. Woche ausfielen. Die Abhängigkeit der Biodiversität von dem jeweiligen Nährstoffangebot in den Reaktoren konnte nachgewiesen werden.

Die Struktur bakterieller Populationen passt sich aufgrund der ökophysiologischen Ansprüche schnell an sich verändernde Lebensbedingungen an. Informationen zur Physiologie nachgewiesener Arten lassen folglich Aussagen über die gegebenen Standortbedingungen zu. Die Identifizierung von sogenannten Leitorganismen mittels DGGE kann dabei als ein erster Schritt auf diesem Weg angesehen werden.

Die Mehrzahl der Sequenzen, die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen wurden, konnten dem Phylum Bacteroidetes und Proteobacteria zugeordnet werden.

Die Bacteroidetes sind ein sehr vielfältiges Bakterienphylum, das sich aus vier Klassen zusammensetzt: den Bacteroidia, den Flavobacteria, den Sphingobacteria und den Cytophagia. Die Flavobacteria bilden die größte Klasse, die zusammen viermal mehr Arten umfasst als die drei anderen Klassen. Die Vertreter des Phylums Bacteroidetes besiedeln verschiedene Habitate, darunter Böden, aquatische Bereiche, den Magen-Darm-Trakt von Tieren, Kompost, Algen, Biofilme oder Belebtschlamm (Bernardet & Nakagawa, 2006; Edwards et al., 2010; Reichenbach, 2006). Sie decken eine physiologische Mischung aus streng anaeroben Bacteroidia bis hin zu aeroben Flavobacteria ab. Es kommen bewegliche und unbewegliche Formen vor - unter den beweglichen gibt es sowohl solche, die mit einer Geißel zum Schwimmen befähigt sind als auch solche, die sich durchs Gleiten fortbewegen (Thomas et al., 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurden zum Phylum Bacteroidetes die Vertreter *Flavobacterium*, *Phaeodactylibacter*, *Sphingobacteriales*, *Saprospiraceae*, *Solitalea* und *Terrimonas* identifiziert.

In Untersuchungen mit ähnlichen Lebensbedingungen wurden bereits die oben genannten Vertreter nachgewiesen. Feng et al. (2016) isolierten *Flavobacterium lutivivi* sp. nov. aus einer Belebtschlammprobe. Nähere physiologische Charakterisierungen von *Flavobacterium lutivivi* sp. nov. ergaben unter anderem ein strikt aerobes Wachstum und die Hydrolyse von Cellulose Derivaten, jedoch keine Fähigkeit Harnstoff oder Nitrat zu reduzieren. Ryu et al. (2007) isolierten *Flavobacterium filum* sp. nov. aus einer Abwasserbehandlung und wiesen dem die Fähigkeit Nitrat zu Nitrit zu reduzieren nach. Lei et al. (2015) identifizierten *Phaeodactylibacter luteus* sp. nov. auf der Mikroalge *Picochlorum*. Eine Umweltsequenz aus der Familie der Saprospiraceae konnte zu 100% einem nicht in Kultur befindlichen Organismus zugeordnet werden, der ebenfalls von Xia et al. (2008) im Belebtschlamm identifiziert wurde. Die Untersuchungen von Xia et al. (2008) ergaben zudem eine Sequenzübereinstimmung von <87% zum Typ Stamm *Haliscomenobacter hydrossis* (ATCC 27775). Die Familie Saprospiraceae besteht aus den Gattungen *Aureispira*, *Haliscomenobacter*, *Lewinella* und *Saprospira*. Weiterhin ergaben ökophysiologische Studien von Xia et al. (2008), dass das *H. hydrossis*-ähnliche Bakterium auf Proteinhydrolyse spezialisiert war und Aminosäuren als Energie- und Kohlenstoffquelle verwendet. Van Veen et al. (1973) isolierten *H. hydrossis* aus dem Belebtschlamm und beschrieben eine aerob-wachsende und eine Glukose-, N-Acetylglucosamin-, Lactose- und Saccharose-hydrolysierende Eigenschaft. Daher wird vermutet, dass *H. hydrossis* im Belebtschlamm an der Hydrolyse von Polysacchariden beteiligt ist und die Hydrolysate als Energie- und Kohlenstoffquellen für das Wachstum nutzt (Xia et al., 2008).

Zudem konnten DNA-Fragmente aus den DGGE-Profilen beider Pilotanlagen dem Phylum Proteobacteria zugeordnet werden. Hierzu zählten die Organismen *Novosphingobium*, *Ideonella*, *Hydrogenophaga*, *Desulfopila*, und *Thiothrix*. Hierbei handelt es sich um Vertreter der Klassen Alpha- bis Deltaproteobacteria.

Die Klasse der Alphaproteobacteria steht in einer engen Beziehung zu aquatischen Lebensräumen, in denen bereits viele dieser Arten nachgewiesen werden konnten. Wie für Proteobacteria typisch, wird ein breites Spektrum an unterschiedlichsten Stoffwechsellleistungen, wie z.B. Photosynthese, Stickstoff-Fixierung und Ammoniak-Oxidation durch diese Alphaproteobacteria abgedeckt. Entsprechendes gilt für die Morphologie der Zellen, wie z.B. gestielte, sternförmige und spiralförmige Zellen (Williams et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Sequenz, die der Signatur des *Novosphingobium resinovorum* Bakteriums ähnelt, identifiziert.

Bereits in anderen Studien wurden die Vertreter der Familie Sphingomonadaceae im Abwasser nachgewiesen (Addison et al., 2007; Kämpfer et al., 2002). Gründe für das

Vorkommen von Vertretern der Gattung *Novosphingobium* könnte die Eigenschaft der Nitratreduktion sein. Kämpfer et al. (2002) isolierten eine neue *Novosphingobium* Art aus einer belüfteten Abwasseranlage, mit der Eigenschaft, Nitrat zu reduzieren. Ebenfalls die Untersuchungen von Takeuchi et al. (2001) berichten von einer positiven Eigenschaft der Gattungen *Sphingomonas* und *Novosphingobium*, Nitrat zu reduzieren, aber nicht für die Gattungen *Sphingobium* und *Sphingopyxis*. Beschrieben wurde die Sphingomonadales von Yabuuchi & Kosako (2005). Dabei sind die vorkommenden Sphingolipide in der äußeren Membran der Zellen namensgebend. Auf der Basis einer phylogenetischen Analyse der 16S-rRNA sowie chemotaxonomischer und phänotypischer Untersuchungen differenzierten Takeuchi et al. (2001) die Familie Sphingomonadaceae in vier weitere Gattungen *Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Novosphingobium* und *Sphingopyxis*. Zudem wiesen Macur et al. (2001) bei Vertretern der Gattungen *Sphingomonas*, *Caulobacter* und *Rhizobium* die Fähigkeit zum Abbau toxischer Verbindung nach. Antibakterielle Wirkung wurde bei *Roseobacter*-Arten beobachtet, aber auch antagonistische Wechselwirkungen zwischen den Bakterien in Algengemeinschaften wurden bereits beschrieben (Brinkhoff et al., 2004; Bruhn et al., 2007; Bruhn et al., 2005).

Auch die Klasse der Betaproteobacteria ist aus metabolischer, morphologischer und ökologischer Sicht sehr heterogen. Betaproteobacteria wurden in die Burkholderiales, die Hydrogenophilales, die Methylophilales, die Neisseriales, die Nitrosomonadales und die Rhodocyclales untergliedert.

Auch in unseren Reaktoren wurden Vertreter der Burkholderiales nachgewiesen. Mit den beiden Arten *Ideonella* sp. als auch *Hydrogenophaga* sp. konnten Organismen nachgewiesen werden, die zu den Leistungen befähigt sind, verschiedene aromatische Substanzen sowie Antibiotika abzubauen (Pérez-Pantoja et al., 2012).

In einer Studie reicherten sie hunderte von Bodenbakterien an, wobei die Antibiotika die einzige Kohlenstoffquelle bildeten. Mehr als die Hälfte ihrer Isolate gehörten den Ordnungen Burkholderiales und Pseudomonadales an (Dantas et al., 2008).

Die Klasse Gammaproteobacteria bilden ebenfalls eine sehr große und vielfältige Gruppe hinsichtlich ihrer metabolischen Fähigkeiten (Stackebrandt et al., 1988; Woese et al., 1985). Basierend auf 16S-rRNA Untersuchungen, wurde die Klasse in 14 Untergruppen eingeteilt: Enterobacteriales, Pseudomonadales, Alteromonadales, Vibrionales, Pasteurellales, Chromatiales, Xanthomonadales, Thiotrichales, Legionellales, Methylococcales, Oceanospirillales, Acidithiobacillales, Cardiobacteriales und Aeromonadales. Obwohl die Mehrheit der Gammaproteobacteria chemo-organotroph ist, umfasst diese Gruppe auch mehrere phototrophe und chemolithotrophe Vertreter (Gao et al., 2009). Zudem sind der bekannte Modellorganismus *Escherichia coli* und die größte bekannte Bakterienzelle

Thiomargarita namibiensis, aber auch eine große Anzahl von Mensch-, Tier- und Pflanzenpathogenen, wie *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Pasteurella* und *Pseudomonas* dieser Klasse zugeordnet (Schulz et al., 1999; Waterfield et al., 2009; Williams et al., 2010).

Über den gesamten Versuchszeitraum konnten mittels DGGE die Signaturen von *Thiothrix eikelboomii* (T2-1) nachgewiesen werden.

Eikelboom Typ 2-1 wurde häufig als Verursacher für Blähschlamm beschrieben. Blähschlamm wird durch das übermäßige Wachstum filamentöser Bakterien verursacht und ist eines der häufigsten Probleme, die zu niedrigerer Reinigungseffizienz führen (Kanagawa et al., 2000; Wanner, 1994). Die Anwesenheit oder Abwesenheit fadenförmiger Organismen in der Kläranlage können als Indikator fungieren. Die Anwesenheit von Vertretern der Gattung *Thiothrix* beschrieben Eikelboom & Van Buijsen (1983) mehr oder weniger als das Ergebnis einer Sauerstofflimitierung im Belüftungstank oder eines abgestandenen Abwassers. Je nach Identität und Häufigkeit sind fadenförmiger Bakterien in Kläranlagen entweder vorteilhaft oder nachteilig. So ist eine gewisse Anzahl von filamentösen Bakterien für eine Flockenbildung erforderlich (Sezgin et al., 1978).

Desulfopila sp., ein Vertreter der Klasse Deltaproteobacteria, wurde mittels DGGE und der anschließenden Sequenzierung des ausgeschnittenen DNA-Fragments in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen. Die Deltaproteobacteria kommen ubiquitär in marinen und terrestrischen Ökosystemen vor. Dabei gelten viele ihrer Lebensräume als "extreme" Umgebungen – von hydrothermalen Prozessen der Tiefsee bis hin zu kalten, dunklen Sulfidhöhlen (Campbell et al., 2006). Die Hauptuntergruppen sind: die Myxobacteria, die Gleitbeweglichkeit zeigen und multizelluläre Fruchtkörper bilden, die Bdellovibrionales, die als Räuber auf anderen Gram-negative Bakterien leben, die Sulfat- und schwefelreduzierenden Bakterien (ihrem Gattungsnamen ist meist Desulfo vorangestellt) und eine Reihe unkultivierbarer Vertreter der Syntrophobacterales (Kerstens et al., 2006).

Gründe für das Vorkommen von *Desulfopila* in unseren Pilotanlagen sind wahrscheinlich die hohen Sulfatgehalte des Abwassers. Sulfat und andere anorganische Schwefelverbindungen dienen *Desulfopila* als Elektronenakzeptoren (Suzuki et al., 2007).

Das DGGE-Profil des eukaryotischen Ansatzes beider Pilotanlagen zeigt ebenfalls Änderungen in der Zusammensetzung. Das Bandenmuster wies zu Beginn durch eine hohe Anzahl von DNA-Fragmenten auf eine hohe Diversität hin. Im Laufe des Versuchs etablierten sich ca. fünf distinkte Banden. Die Sequenzergebnisse der fünf DNA-Fragmente ergaben eine Übereinstimmung zu *Chlorella*, *Neocystis*, *Spermatozopsis*, *Chlamydomonas* und einer unbekanntem Cryptomycota-Art. Im Vergleich zum bakteriellen DGGE-Profil ist eine schnellere Stabilisierung der Zusammensetzung der Diversität zu erkennen. *Chlorella*

vulgaris wurde als Inokulum eingesetzt, daher ist es nicht verwunderlich, dass diese Art in den Flocken identifiziert wurde. Zudem wurde *Chlorella* bereits in verschiedensten Abwässern erfolgreich kultiviert. Sowohl ihre Robustheit, die hohe Wachstumsrate und der Lipidgehalt machen *C. vulgaris* geeignet für die Abwasserreinigung. Da die Pilotanlagen oben offen sind, ist ein Eindringen anderer Mikroalgen in das System möglich. Auch kann bereits das zu reinigende Abwasser diverse Mikroalgen in das System miteinführen.

Die DGGE-Profile ergaben einen Einblick über die Veränderungen der mikrobiellen Populationen innerhalb des 15-wöchigen Versuchs. Es konnte gezeigt werden, dass bis zur 6. Betriebswoche in beiden Reaktoren Änderungen in der bakteriellen und eukaryotischen Diversität stattfanden. Die zunehmende Abundanz bestimmter Leitorganismen deutet auf die Bildung einer stabilen ALBA-Biozönose hin. Zudem kann die Veränderung der Populationsstruktur, als ein Hinweis auf eine Anpassung an die Zusammensetzung des Abwassers gedeutet werden. Durch die Sequenzierung von DNA-Fragmenten konnte eine hoch diverse mikrobielle Zusammensetzung in den Pilotanlagen nachgewiesen werden. Allerdings müssen aus den bereits genannten Gründen einige Ergebnisse der DGGE unter Vorbehalt betrachtet werden. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Ergebnisse der DGGE einen ersten Überblick über die Populationsstruktur in den Reaktoren ermöglichten.

In den vergangenen Jahren entstanden neue Möglichkeiten, mikrobielle Diversität mittels Hochdurchsatzsequenzierungen zu untersuchen. Hierdurch wurde es möglich, eine hohe Anzahl von Sequenzabschnitten parallel zu sequenzieren und bioinformatisch auszuwerten. Dieses Verfahren erlaubt neben der Identifizierung von mikrobiellen Gemeinschaften auch eine Aufklärung der relativen Häufigkeiten einzelner Taxa.

Um die Informationen aus DGGE zu verifizieren und zu ergänzen, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Illumina/MiSeq-Sequenzanalyse durchgeführt. Von mindestens 500000 Reads pro Zeitpunkt entstand ein detaillierter Einblick in die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft des 800 L-Reaktors in der 2., 8. und 15. Woche.

Die Zusammensetzung der Organismen in einer Biozönose ist abhängig von etlichen äußeren Rahmenbedingungen wie z.B. Temperaturveränderungen, wechselndes Nährstoffangebot, Lichtverfügbarkeit, Wetterbedingungen, Abwasserqualität u.v.m. Anhand der hier durchgeführten Populationsanalyse per MiSeq konnte nachgewiesen werden, dass das Phylum Proteobacteria eine dominante Stellung (>50 %) in den Wochen 2, 8 und 15 einnahm. Bei näherer Betrachtung innerhalb der Klassen der Proteobacteria war eine

Verschiebung der relativen Häufigkeiten der Klassen Alpha-, Beta- und Gammaproteobacteria nachzuweisen.

Auffallend bei der Klasse der Alphaproteobacteria war die hohe Abundanz in der achten Woche. Eine differenzierende Auswertung innerhalb der Ordnungsebene ergab eine Zunahme der Häufigkeit von Vertretern der Ordnungen Rhizobiales, Sphingomonadales und Rhodobacterales. Insbesondere die Gattung *Novosphingobium* wurde in der achten Woche identifiziert. Die nachgewiesenen Sequenzen ließen sich den Arten *Novosphingobium letnum*, *aromaticivorans*, *yangbajingensis*, *hassiacum*, *acidiphilum* und *nitrogenifigens* zuordnen. Gründe für die hohe Anzahl von Vertretern der Gattung *Novosphingobium* in der achten Woche könnten durch den Ausfall der Zudosierung von Stickstoff, der in diese Zeit fiel, bedingt sein. Dieser Populationswechsel, zur hohen Abundanz der Ordnung Sphingomonadales in der achten Woche, lässt auf vorteilhaftere Nährstoffbedingungen dieser Vertreter schließen.

Bakterien der Ordnung Sphingomonadales sind meist in kohlenstoffreichen und stickstoffarmen Lebensräumen vertreten (Strabala et al., 2012). Addison et al. (2007) isolierten *Novosphingobium nitrogenifigens* aus einer Zellstoff- und Papierabwasseranlage in Neuseeland und beschrieben die erste stickstofffixierende Spezies der Gattung *Novosphingobium*.

Ebenfalls *Novispirillum*- (Rhodospirillales), aber auch *Rhodobacter*-Vertreter (Rhodobacterales) wurden in der 8. Woche häufig identifiziert. Beide gehören zu den Nichtschwefelpurpurbakterien und können photoautotroph unter anaeroben und mikroaerophilen-Lichtverhältnissen wachsen und organische Verbindungen nutzen.

Hiraishi et al. (1991) wiesen ebenfalls eine hohe Anzahl von Nichtschwefelpurpurbakterien in einem Belebtschlammreaktor nach. Auch die Untersuchungen von Zhang et al. (2012) zeigten eine hohe Präsenz von Alphaproteobacteria-Vertreter in einem anaeroben SBR-Betrieb. Die Anwesenheit dieser Bakterien in unserer Pilotanlage spricht für eine Sauerstofflimitierung im Reaktor in der achten Woche.

Die Betaproteobacteria waren zunächst durch die Ordnung Burkholderiales am häufigsten in der Pilotanlage vertreten. Hierbei wurde zum größten Teil *Rubrivivax* identifiziert und ein kleiner Anteil *Hydrogenophaga*. Beide Gattungen gehören der Familie der Comamonadaceae an, deren Vertreter meist aerob und chemoorganotroph leben. Nagashima et al. (2012) beschreiben *Rubrivivax* als fakultativ photoheterotrophes Bakterium, das in Süßwasserteichen, Klärgräben und Belebtschlämmen lebt. Kämpfer et al. (2005) wiesen *Hydrogenophaga* in einer Abwasseranlage nach.

In den weiteren Wochen nahm die Häufigkeit der Betaproteobacteria rapide ab. Bezugnehmend auf den Vertreter der *Hydrogenophaga* ist diese Erkenntnis auch auf dem DGGE-Profil zu erkennen. Die hohe Präsenz dieser Bakterien in der zweiten Woche weist auf die Verfügbarkeit von Sauerstoff in den Reaktoren hin. Ebenfalls nahm die Häufigkeit von Vertretern der Gammaproteobacteria von Woche 2 zur 8. Woche ab. Eine Verschiebung der Populationszusammensetzung der dominierenden Ordnung Thiotrichales mit den Hauptvertreter *Thiothrix eikelboomii* wurde in der 8. Woche häufiger durch Xanthomonadales mit *Steroidobacter denitrificans* ersetzt. In der 15. Woche wiederum wurden $\frac{3}{4}$ der Sequenzen den Gammaproteobacteria und größtenteils der Ordnung Thiotrichales mit der Spezies *Thiothrix eikelboomii* zugeordnet. Diese Veränderungen der Zusammensetzung sind mit der Sulfatkonzentration des Abwassers erklärbar. Die Sulfatkonzentration des Abwassers lag in den Wochen 5-10 mit Werten von durchschnittlich $27,7 \pm 16 \text{ mg L}^{-1}$, sehr viel niedriger als in den vorigen (Woche 1-4: $49,65 \pm 12 \text{ mg L}^{-1}$) und darauffolgenden Wochen (Woche 10-15: $48 \pm 24,5 \text{ mg L}^{-1}$). In der 13. bis 15. Woche wurden die höchsten Sulfatwerte gemessen ($55,6 \pm 21 \text{ mg L}^{-1}$). Diese korrelieren mit der Zunahme der Anzahl von Angehörigen der Ordnung Thiotrichales in der 15. Woche. Das Auftreten von Schwefelbakterien kann auf einen hohen Gehalt an Schwefelverbindungen, die in reduzierter Form im Zulauf vorliegen, oder auf anaerobe Zustände in der Anlage hindeuten. *Thiothrix*-Arten wurden häufig in Kläranlagen gefunden, deren Abwasser hohe Konzentrationen an Sulfid enthielten.

Die Ergebnisse der Metagenomanalyse zeigen eine deutliche Korrelation zwischen Populationsstruktur und den vorherrschenden Bedingungen, besonders in der Zusammensetzung des Abwassers.

Carney et al. (2014) untersuchten ebenfalls täglich über einen Zeitraum von 13 Tagen mittels Illumina/MiSeq-Sequenzierung die Populationsstruktur eines PBRs mit Mikroalgen, die in kommunalem Abwasser wuchsen. Hierbei ergab die Analyse, dass sich die Struktur der Populationen täglich änderte. So dominierten beispielweise anfänglich Bakterien der Klasse Gammaproteobacteria, während nach der Zugabe exogener Nährstoffe die Abundanz sich zu Gunsten der Vertreter der Klassen Cytophagie, Flavobacteria und Sphingobacteria formierte.

Insgesamt ließ sich sowohl durch die DGGE-Profile als auch durch die Illumina/MiSeq-Sequenzierung erkennen, dass sich innerhalb der 15 Wochen die Zusammensetzung der Mikroorganismen den Bedingungen anpasste. Beispielsweise war zu erkennen, dass der Ausfall der Dosierung von Harnstoff (4.-9. Woche) und Phosphat (4.-11. Woche) zur Folge die Änderung der Zusammensetzung der Mikroorganismen in der 8. Woche hatte. Allerdings hatten diese Veränderungen offenbar keinen negativen Einfluss auf die Reinigungsleistung der Anlage.

Desintegration & Quantifizierung

Eine entscheidende Rolle bei der Reinigung von Abwässern mittels Algen und Bakterien spielt das Zahlenverhältnis von Mikroalgen und Bakterien innerhalb der Flocken. Die Quantifizierung der individuellen Konzentration der Biomassen und somit die Überwachung der optimalen Algen-Bakterien-Verhältnisse ermöglicht eine bessere Prozesskontrolle, um ein effizientes und energiefreundliches System zu schaffen (für ein produktives Konsortium zur Bioremediation). Diesbezüglich können unausgewogene Systeme die Abwässer nur ineffizient klären (Su et al., 2012c). Bereits das eingestellte Anfangsverhältnis des Inokulums Algen zu Bakterien führt zu unterschiedlichen Behandlungswirkungsgraden (Su et al., 2012c). Somit ist es erforderlich, über den Prozesszeitraum optimale ALBA-Verhältnisse einzustellen und jederzeit kontrollieren zu können. Shriwastav et al. (2015) und Cromar & Fallowfield (2003) entwickelten Protokolle zur Bestimmung von Algen- und Bakterienkonzentrationen aus Mischsuspensionen aus Algen und Bakterien. Jedoch wurden diese und andere verfügbare Protokolle für homogene Suspensionen bestehend aus Mikroalgen und Bakterien entwickelt, entweder durch das Zählen von Algen unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer, durch die Färbung mit DAPI oder durch die Bestimmung mittels einer Bildanalyse. Für eine zuverlässige Quantifizierung innerhalb der kompakten ALBA-Flockenstruktur sind diese Techniken eher problematisch. Daher wurden in dieser Arbeit vier Desintegrationstechniken zur schonenden Trennung von ALBA-Flocken getestet. Es wurden vier verschiedene Ansätze durchgeführt, nämlich biologische, chemische, physikalische und mechanische Behandlungen.

Die biologische Behandlung mittels Enzymen, mit dem Ziel EPS abzubauen und somit die Stabilität der ALBA-Flocken zu vermindern, ergab keinen erkennbaren Desintegrationserfolg ($3,33 \pm 3,05\%$). Die Zusammensetzung der EPS hängt vom Abwassertyp und den Betriebsbedingungen der Kläranlage ab (Sponza, 2003). Es variiert stark in der Zusammensetzung und damit in den chemischen und physikalischen Eigenschaften (Sutherland, 2001). Verschiedene hochmolekulare Verbindungen der EPS, wie Polysaccharide, Proteine, Nukleinsäuren oder Huminsäuren und die ionisierbaren funktionellen Gruppen, wie Carbonsäure-, Phosphoramino- und Hydroxylgruppen (Guibaud et al., 2008), begrenzen die Kapazität der eingesetzten Enzyme, um die EPS der ALBA-Flocken abzubauen. Des Weiteren hat sich herausgestellt, dass die Verwendung der ausgewählten Enzyme nicht wirksam war, da die vorliegende EPS hauptsächlich aus Lipiden bestand.

Bei der chemischen Behandlung mittels verschiedener Formaldehydkonzentrationen ergab der Einsatz von 1%-iger Formaldehydlösung nach 240 min einen $56 \pm 5\%$ Desintegrationserfolg der ALBA-Flocken. Formaldehyd wurde verwendet, um die

Morphologie der Zellen zu fixieren und Zellysis zu verhindern. Die Zugabe von NaOH erhöht den pH-Wert, was zu einer Trennung zwischen sauren Gruppen in den EPS (Comte et al., 2006) und damit zu einer Lockerung der stabilen ALBA-Flocken führt. Überraschenderweise erreichte eine Formaldehydkonzentration von 0,6% einen niedrigeren Desintegrationserfolg nach 60 min im Vergleich zu einer Konzentration von 0,2 und 1%. Gründe hierfür können in der Zusammensetzung der EPS liegen. Zu Beginn der Formaldehyd-Behandlungen war die Größe der Flocken im gleichen Größenbereich. Möglicherweise war die Zusammensetzung der EPS in den einzelnen Flocken unterschiedlich und die mit 0,6% Formaldehydkonzentration behandelten Flocken enthielten mehr saure Gruppen. Denn nach 60 min wurde die NaOH-Lösung zugegeben und der Desintegrationserfolg der 0,6%-igen Formaldehydkonzentration behandelten Flockenprobe erreichte einen ähnlichen Desintegrationslevel, wie die der anderen Konzentrationen. Allerdings verringerte sich die photosynthetische Aktivität der Mikroalgen bereits bei niedrigeren Formaldehydkonzentrationen erheblich. Die Membranen der Chloroplasten degenerierten, die Zelle jedoch behielt ihre Form bei. Formaldehyd behandelte ALBA-Flocken erschienen für weitere biochemische Anwendungen nicht geeignet, eine mikroskopische Zellzählung war allerdings noch möglich.

Der Desintegrationserfolg der mechanischen Behandlung mit Glaskugeln wurde mit drei Glaskugelgrößen und unterschiedlicher Behandlungszeit getestet. Der Desintegrationserfolg der ALBA-Flocken mittels 3 mm großen Glasperlen erreichte 80% bei einer 80-sekündigen Anwendung. Die Kugelmühlen zerkleinern Proben mit feinen Kügelchen durch Vibrationen (Yu et al., 2015). Die hier verwendeten Größen der Glaskügelchen zerstörten jedoch nicht die Algenzellen, und senkten die Photosyntheseaktivität nur etwa um 10%. Der Desintegrationserfolg wurde durch die Dauer der Anwendung und nicht durch die Kugelgröße beeinflusst. Jedoch haben interne Versuche gezeigt, dass kleinere Kugeln (0,25 mm Durchmesser) die *Chlorella*-Zellen zerstören (Daten nicht gezeigt).

Der Grad der Störung hängt vor allem vom Kontakt zwischen Biomasse und Kugeln, der Größe, der Form und Zusammensetzung der Kugeln und der Mikroalgenzellwand ab. Die Untersuchungen von Doucha & Livansky (2008) zeigten, dass der Durchmesser der Kügelchen die Reibungsleistung beeinflusst. In ihren Versuchen wurden etwa 90% der *Chlorella*-Zellen mit dem 0,35-0,50 mm und ca. 80% mit dem 0,5-0,7 mm Kugeldurchmesser zerstört. Eine anschließende Zellzählung war aufgrund der zerstörten Zellen nicht mehr möglich. Die Untersuchungen von Leupold et al. (2013) ergaben, dass die Photosyntheseaktivität und das Wachstum von *C. vulgaris* zusätzlich zu anderen Faktoren noch von der Mischgeschwindigkeit und der Scherkraft abhängt. Dabei erzielte *C. vulgaris* höhere Photosyntheseaktivität und 48%-iges höheres Wachstum mit einer optimalen

Mischgeschwindigkeit von 126 cm s^{-1} und einer Scherkraft von $2,09 \text{ cm s}^{-1}$ (Leupold et al., 2013).

Die physikalische Behandlung mittels Ultraschall zeigte den besten Desintegrationserfolg mit 92% (40 W, 6 min) mit einer 17% Abnahme der photosynthetischen Aktivität. Die Verwendung des Ultraschalls wird häufig für den Aufschluss von Mikroalgenzellen benutzt (Halim et al., 2013). Ultraschallwellen bilden Kavitationsblasen, die anschließend kollabieren. Die Kavitations-Implosion erzeugt extrem lokalisierte Stoßwellen, die die Mikroalgenzellen zerstören können (Chisti & Mooyoung, 1986). Park et al. (2015) zeigten, dass die Beschallung mit $1,5 \text{ W mL}^{-1}$ für 20 min die dicke und starke Zellwand von *C. vulgaris* nicht beschädigt. Rajasekhar et al. (2012) wiesen eine minimale Beeinträchtigung des Wachstums der *Chlorella sp.*-Zellen bei einer Ultraschallbehandlung bei $0,085 \text{ W mL}^{-1}$ für 20 min nach. Im Gegensatz führte die gleiche Behandlung des Cyanobakteriums *Anabaena circinalis* zu starken Wachstumshemmungen. In dieser Arbeit wurden *Chlorella*-Zellen bei einer 10-minütigen Beschallung mit 24 W mL^{-1} (120 W) zerstört. Yu et al. (2015) verdeutlichten den Einfluss unterschiedlicher Zellaufschlussmethoden bei der Mikroalgen-Spezies *Chlorella sorokiniana* auf die Menge der Lipidextraktionsausbeute. Die Untersuchungen von Janczyk et al. (2007) zeigten ebenfalls, dass eine Ultraschallbehandlung die Zellwand von *Chlorella* stärker schädigte, als eine Elektroporation. Joyce et al. (2014) beobachteten, dass eine Akkumulation aus *Nannochloropsis oculata*-Zellen nach der Beschallung von $0,086 \text{ W cm}^{-3}$ in einzelne und homogenen Zellen zerfielen. In dieser Arbeit löste eine Beschallungszeit von 6 min (40, 80 oder 120 W) die kompakten ALBA-Flocken um 92% in eine homogene Probe und erhöhte die Menge an freien Zellen (Pell et al., 2016).

Beide Durchführungen, sowohl Homogenisation mittels Glaskugeln als auch die Ultraschallbehandlung, erreichten einen Desintegrationserfolg von 80 bzw. 92%. Der Hauptvorteil der Glaskugelbehandlung ist die 4,5-fache Verringerung der Arbeitszeit, die 80 Sekunden beträgt, verglichen mit der Ultraschallbehandlung von 6 min. Darüber hinaus war der Einfluss auf die photosynthetische Aktivität der behandelten Zellen mit Glaskugeln geringer als die bei der Ultraschallbehandlung. Beide Methoden sind sehr effektiv und einfach während der Routineanalyse zu integrieren. Die Kosten der Geräte für beide Methoden liegen in der gleichen Preisklasse und sind in den meisten F & E-Einrichtungen vorhanden. Die Tatsache, dass ALBA-Flocken nach dem Glaskugel- oder Ultraschallbehandlung noch lebensfähig sind, ist ein zusätzlicher Vorteil. Hierdurch wird eine detaillierte Analyse der Mikroalgen-Biomasse nach der Behandlung, wie z. B. Fettsäure- oder Pigmentanalyse, ermöglicht. Darüber hinaus kann die Methode auch auf ALBA-Flocken mit anderen Algenarten erweitert werden.

Somit eigneten sich zwei Desintegrationsmethoden, um eng verbundene ALBA-Flocken schonend aufzubrechen (Pell et al., 2016) und anschließend mittels vorhandener Methoden Mikroalgen und Bakterien zu quantifizieren. Da nur eine begrenzte Zahl geeigneter Quantifizierungsmethoden für Mischproben aus Algen und Bakterien zu Verfügung stehen, die zudem noch methodisch sehr aufwendig sind, erfolgte im weiteren Schritt die Entwicklung einer photometrischen Quantifizierungsmethode. Mittels photometrischer Verfahren die Konzentration unterschiedlicher Stoffe in einer Probe zu bestimmen, wird auch in anderen Bereichen bereits genutzt, z.B. bei der DNA-Reinheitsbestimmung.

Für die photometrische Methode wurden zunächst die theoretischen Voraussetzungen der additiven Überlagerung der Absorptionsspektren von Mikroalgen und Bakterien sowie die Gültigkeit des Lambert-Beer'schen Gesetzes für die Mikroalge *C. vulgaris* und der Bakterien bei den entsprechenden Biomassekonzentrationen praktisch überprüft und erfüllt (additive Überlagerung siehe Abb. 32). Die Extinktionen der Mikroalgen und der Bakterien (Belebtschlamm) verliefen proportional zur Trockensubstanz.

Anschließend wurden zwei Koeffizientenmatrizen (3.9.1) (Extinktionsmodelle) erstellt und mit MATLAB® berechnet. Die aufgestellten Modelle ergaben hinsichtlich ihrer Genauigkeit zur Bestimmung von voreingestellten Verhältnissen präzise Ergebnisse (Abb. 33). Das Modell 2 war genauer, da dieses an den voreingestellten Verhältnissen kalibriert wurde. Bemerkenswert ist trotz alledem die geringe Abweichung aller Messpunkte zu den berechneten Werten.

Die entwickelte Quantifizierungsmethode zeichnet sich durch einen geringen Zeitaufwand und eine einfache Handhabung aus. Für die Durchführung wird eine geringe Probenmenge benötigt. Falls die Probe, wie in dieser Arbeit, kompakte ALBA-Flocken sind, ist vorab eine schonende Desintegration durchzuführen. Für die anschließende Durchführung ist ein Photometer notwendig. Die Arbeitsschritte beschränken sich insgesamt auf etwa 15 Minuten. Im Gegensatz dazu sind die entwickelten Methoden von Cromar & Fallowfield (1992) und Shriwastav et al. (2015) um einiges umständlicher. Shriwastav et al. (2015) entwickelte eine Methode zur Einschätzung einzelner Konzentrationen von Algen und Bakterien in gemischten Suspensionen. Dazu werden die Mikroalgen manuell mit Hilfe einer Kammer (Hemocytometer) gezählt und anschließend durch einen berechneten Umwandlungsfaktor in TS konvertiert. Die Bakterienkonzentration wird dann durch die Subtraktion des Mikroalgenanteils von der Gesamt TS bestimmt. In einem zweistufigen Verfahren trennten Cromar & Fallowfield (1992) die Probe eines High Rate Algal Ponds (HRAP) in einzelne Bestandteile wie Algen, Bakterien und Detritus und bestimmten anschließend die Biomassenkonzentration. Dazu wurde eine mechanische und chemische Desaggregation der konzentrierten HRAP Proben durchgeführt, gefolgt von einer Zentrifugation mittels eines

fertigen Percoll® / Saccharose-Dichtegradienten. Anschließend ermöglicht die Methode eine gravimetrische Bestimmung, indem die Fraktionen einzeln mit einer Pipette entfernt werden. Weiterhin wurde diese Methode durch die Bestimmung der Fraktionen mittels einer mikroskopischen Bildanalyse erweitert (Cromar & Fallowfield, 2003).

Mittels der entwickelten Quantifizierungsmethode wurde die Entwicklung der einzelnen Konzentrationen von Algen und Bakterien in zwei Bioreaktoren mit unterschiedlichen Anfangsverhältnissen untersucht. Dies sollte Einsichten über die Dynamik und das Zusammenleben von Bakterien und Algen in den Flocken geben und letztendlich eine effizientere Prozessführung ermöglichen. Dabei fiel auf, dass die hier untersuchten Anfangsverhältnisse von 1,5 zu 1 und 2 zu 1 (Mikroalgen zu Bakterien) am letzten Tag der Batchversuche bei ca. 2 zu 1 waren. Dies deutet auf ein natürliches Einspielen beider Gruppen auf das Zahlenverhältnis von 2 zu 1 hin. Neben den hier dargestellten Verhältnissen wurde weiterhin ein Verhältnis von 1:1 untersucht (Daten nicht gezeigt), dieses nahm ebenfalls auf ein Zahlenverhältnis von 2:1 zu. Erwähnenswert ist dabei, dass ein Batch 7 Tage dauerte und der CSB-Gehalt des Abwassers nur gering abnahm. Ebenfalls ergaben die Berechnungen der Nettophotosyntheserate der Mikroalgen und der Sauerstoffverbrauchsrate des Belebtschlammes von Gutzeit et al. (2005) ein theoretisches optimales ALBA-Verhältnis von 2:1. Weiterhin sollten weitere Verhältnisse mit dieser Methode getestet werden, um dieses Phänomen des Einspielens der Zahlenverhältnisse von 2:1 zu bekräftigen.

Da die photometrisch quantifizierten Verhältnisse zu Beginn bereits etwas abwichen (1,5:1 lag bei 1,4:1 und das 2:1 lag bei 2,3:1), lässt sich nicht mit Gewissheit beurteilen, wie viele Mikroalgen eventuell nach dem Zentrifugieren im Überstand verblieben sind. In der von mir mitbetreuten Bachelorarbeit von Steinbrecher (2016) wurden insgesamt 3 unterschiedliche Berechnungsmodelle mit zwei verschiedenen Matrizen (die Matrizen siehe 3.9.1) getestet: die komplette Aufnahme des Wellenbereichs 320- 800 nm, die Aufnahme spezieller Wellenlängen (495 nm und 690 nm) und die Differenz der Steigungen zwischen den Wellenlängen 680 nm und 665 nm, 690 nm und 495 nm, 640 nm und 495 nm, 495 nm und 445 nm und zwischen 445 nm und 405 nm. Allerdings wichen die berechneten Verhältnisse aus diesen drei Modellen erheblich voneinander ab, sodass mittels des zusätzlichen Parameters TS, die Modelle, deren Werte am besten mit den tatsächlich gemessenen TS übereinstimmen, gestützt wurden. Dabei berechnete Steinbrecher (2016) die mittleren, relativen Abweichungen von berechneten und gemessenen TS aller Bioreaktoren für alle Versuchstage in Prozent. Das Steigungsberechnungsmodell mit einer 7,5%-igen mittleren, relativen Abweichung erwies sich hierbei als das am wenigsten geeignete. Das Modell mit den speziellen Wellenlängen schnitt mit einer relativen Abweichung von 6,3% etwas

schlechter ab als das Modell mit der kompletten Aufnahme des Wellenlängenbereichs mit 4,2%. In der vorliegenden Arbeit wurden daher die Ergebnisse aus dem Berechnungsmodell mit der kompletten Aufnahme des Wellenlängenbereichs in der Anwendung (4.4) verwendet und diskutiert.

Insgesamt ist festzuhalten, dass mit allen drei Berechnungsmodellen Verhältnisse von Mikroalgen und Bakterien berechnet werden können. Jedoch welche Verhältnisse die Wirklichkeit widerspiegelt, lässt sich nicht genau sagen, da dies unbekannt ist. Mit Hilfe der Bestimmung der TS als Kontrollparameter wurde gezeigt, dass alle drei Modelle unter einer 10%-igen mittleren, relativen Abweichungen lagen, und das beste Modell (mit kompletter Aufnahme des Wellenlängenbereichs) sogar bei 4,2%. Auch im Verhältnis zuvor eingestellten und berechneten Verhältnissen (Abb. 33) waren die Ergebnisse sehr präzise. Somit kann die entwickelte Methode zur Quantifizierung der Algen- und Bakterienanteile in Mischproben als sehr gut eingeschätzt werden und in vielen Bereichen Anwendung finden: Nicht nur bei der Abwasserreinigung mittels Mikroalgen und Bakterien, sondern auch bei großtechnischen Kultivierungsanlagen von Mikroalgen könnte der Kontaminationsanteil der Bakterien quantifiziert werden. Weitere Mikroalgen Spezies sollten getestet werden, um die Möglichkeiten und Grenzen der entwickelten Methode zu erfassen.

Sauerstoffdynamik

Mittels der Desintegrationsmethode und der photometrischen Quantifizierungsmethode ist es möglich, das Algen-Bakterien-Verhältnis in laufenden Systemen zu ermitteln. Trotz alledem stellt die Sauerstoffverfügbarkeit im ALBA-System eine zusätzliche Problematik in der Anwendung dar. In der herkömmlichen Abwasserreinigung wird die Sauerstoffversorgung der Bakterien durch energieintensives Einblasen von Luft sichergestellt. Je schneller und je mehr Stoffe abgebaut werden, desto mehr Sauerstoff wird benötigt. In mikroalgenbasierten Systemen wurde der photosynthetisch produzierte Sauerstoff als limitierender Faktor ermittelt (Guieysse et al., 2002; Munoz & Guieysse, 2006).

Der Verlauf der Sauerstoffkonzentration in allen vier Laborbatch-Versuchen zeigte auffällige Übereinstimmungen. Nach erneuter Zugabe von Abwasser wurde in den darauffolgenden beiden Tagen kein freier Sauerstoff im Reaktor detektiert. Ein positiver Sauerstoffwert wurde erst ab dem 3. Tag im Reaktor gemessen. Sobald das Abwasser einen CSB-Gehalt von ca. 100 mg L^{-1} erreichte, lag gelöster Sauerstoff vor. Möglicherweise ist dieses Ergebnis auf eine verminderte respiratorische Aktivität der Bakterien zurückzuführen.

Su et al. (2011) untersuchten ein ähnliches Phänomen bei ihren Versuchen. Nach erneuter Zugabe von Abwasser sanken die Sauerstoffwerte auf etwa null, erhöhten sich nach drei

Tagen auf etwa 2 mg L^{-1} und stiegen weiter bis etwa $5,5 \text{ mg L}^{-1}$. Su et al. (2011) begründen den anfänglichen Verzehr des Sauerstoffs (des aus der Algen-Photosynthese freigesetzte O_2) mit sauerstoffzehrenden Prozessen, wie die heterotrophe Kohlenstoffoxidation und Nitrifikation.

Die Aktivität der Mikroorganismen wird vom Nahrungsangebot beeinflusst, aber auch von der Temperatur sowie der Existenz toxischer oder hemmender Stoffe. Ein hoher Gehalt an organischen Verbindungen steigert die Umsatzrate der Substrate durch die Bakterien. Die gesteigerte Aktivität bedingt wiederum einen erhöhten Sauerstoffverbrauch.

Durch die Messungen mittels des Nadel- Sauerstoff- Mikrosensors wurde ebenfalls bestätigt, dass die Sauerstoffproduktion unmittelbar in den Flocken erfolgte. Bei Dunkelheit wurde der Sauerstoff in den Flocken komplett verbraucht, bei Belichtung wiederum stieg die Sauerstoffkonzentration auf einen überproportional hohen Wert an.

Durch die kompakte ALBA-Flockenstruktur steht der durch die Algenphotosynthese produzierte Sauerstoff den Bakterien für ihre Stoffwechselforgänge direkt zur Verfügung. Wahrscheinlich fungiert die EPS dabei als Diffusionsbarriere, weswegen weniger Sauerstoff im Überstand gemessen werden kann. Bei einer starken Beleuchtung ($1050 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$) stellte der Sauerstoff sowohl innerhalb der Flocke als auch im Überstand keinen limitierenden Faktor dar.

Die erzielten Ergebnisse mittels der Sauerstoffoptode als auch mit dem Nadel-Sauerstoff Mikrosensor unterstützten die These, dass das System trotz scheinbaren Sauerstoffmangels nicht zusammengebrochen, sondern der Sauerstoff innerhalb der kompakten ALBA-Flocken vorhanden war. Die Vorteile kompakter ALBA-Flocken sind die Anreicherung des Sauerstoffs innerhalb der Flocke, der Zugang der Substanzen für Bakterien und Mikroalgen in unmittelbarer Nähe für ihre Stoffwechselforgänge und die zur Ernte schnell absetzbare Biomasse.

Trotz alledem sollte eine ausreichende Sauerstoffversorgung für den bakteriellen Anteil zum Abbau der organischen Substanzen gewährleistet werden. Daher wurde die Sauerstoffproduktion der Mikroalge *C. vulgaris* in Abhängigkeit der Zelldichte untersucht (Abb. 23 bis Abb. 25). Eine zu hohe Algenkonzentration führt zur gegenseitigen Beschattung der Zellen und somit zu einer Verringerung der photosynthetischen Effizienz sowie zur Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs während der Dunkelphase (Guieysse et al., 2002). Auch beeinflusst eine hohe Algenkonzentration signifikant die Umsatzrate von Stickstoff- und Phosphor (Lau et al., 1995). Nach Gutzeit et al. (2005) ergaben sich aus der Nettophotosyntheserate der Mikroalgen und der Sauerstoffverbrauchsrate des Belebtschlammes ein theoretisches optimales ALBA-Verhältnis von 2:1. Bei der klassischen

Untersuchung der Photosyntheseleistung wurde ein optimaler Sauerstoffproduktionsbereich in Abhängigkeit von der Algenkonzentration für *C. vulgaris* erfasst (Abb. 23). Dieser lag zwischen 0,2 - 0,9 g L⁻¹ TS mit einer max. Produktionsrate von 0,3 bis 0,4 nmol O₂ mL⁻¹ s⁻¹. Im Gegensatz dazu ermittelten Sarrafzadeh et al. (2015) bei einer konstanten Lichtintensität von 100 µmol Photonen m⁻²s⁻¹ eine lineare ansteigende max. Produktionsrate bis 0,8 nmol O₂ mL⁻¹ s⁻¹ bis zu einem TS-Gehalt von 1 g L⁻¹ *C. vulgaris*. Ab 2-10 g L⁻¹ TS blieb die Produktionsrate bei ca. 1 nmol O₂ mL⁻¹ s⁻¹ gleichbleibend. Sehr hohe, übersättigte Sauerstoffkonzentrationen können sich in wachsenden Kulturen von photoautotrophen Mikroorganismen aufbauen. Bei der *C. vulgaris* Kultivierung in einem 100 m² Raceway-Pond wurden Sauerstoffkonzentrationen von 25 bis 40 mg L⁻¹ gemessen (Weissman et al., 1988), und 8 bis 30 mg L⁻¹ bei *Scenedesmus sp.* (Mendoza et al., 2013). Bei der *Spirulina platensis*-Kultivierung in einem 450 m² Raceway-Pond, wurden im Winter 10 mg L⁻¹ (115% der O₂-Sättigung) und im Sommer 30 mg L⁻¹ (375% Sättigung) gemessen. Dabei wurde ein Rückgang der Biomassen-Konzentration festgestellt, wenn die Sauerstoffkonzentration über 25 mg L⁻¹ lag (Jiménez et al., 2003). Die in dieser Arbeit gemessene maximale Produktionsrate von 0,3 bis 0,4 nmol O₂ mL⁻¹ s⁻¹ entspricht ca. 35 bis 45 mg O₂ L⁻¹ h⁻¹. Weissman et al. (1988) beobachteten bei *Chlorella sp.* eine hemmende Wirkung auf die Photosynthese bei einem Wert von 25 mg O₂ L⁻¹.

So lassen die erhaltenen Ergebnisse darauf schließen, dass die Zelldichte von *C. vulgaris* in der Abwasserreinigung zwischen 0,2- 0,9 g L⁻¹ TS liegen sollte, da in diesem Bereich eine gleichbleibende maximale Sauerstoffproduktionsrate erzielt wird und ein gleichbleibender Lichtsättigungspunkt herrscht, der durchschnittlich bei 280 µmol Photonen m⁻² s⁻¹ lag. Gleichzeitig sollte die Konzentration des Belebtschlammes angepasst werden, um ein gutes Gleichgewicht zwischen Sauerstoffproduktion durch die Mikroalgen und Sauerstoffverbrauch durch die Bakterien zu erhalten.

Die Maximierung der Photonenkonversionseffizienz ist einer der Schlüsselfaktoren bei der Kultivierung von Mikroalgen. Die Effizienz wird durch verschiedenste Parameter wie pH, Temperatur, Nährstoffverfügbarkeit, Schadstoffbelastung und auch Photostress beeinflusst. Um Prozesse mikroalgenbasierter Kläranlagen zu verbessern, ist die Kenntnis über die höchste Effizienz erforderlich.

Die erzielten Ergebnisse mittels Dual Pam lassen auf einen optimalen ETR_{max}-Bereich, abhängig von der Algenkonzentration, schließen. Die maximale ETR bei ca. 0,8 g L⁻¹ bis 1,2 g L⁻¹ Biomasse lag bei 120 µmol e⁻ m⁻² s⁻¹, bei einer Lichtintensität von ca. 380-400 µmol Photonen m⁻² s⁻¹. Maximale ETR in diesem Bereich wird erreicht, da Zelldichten der Kultivierung für die anliegende Lichtintensität im Multikultivator physiologisch optimal sind. Die Ergebnisse bei dünneren Zelldichten weisen auf Lichtstress hin, und bei den Zelldichten

1,6-2 g L⁻¹ auf eine Dunkeladaption. Jede einzelne Mikroalgen-Zelle bei der Kultivierung einer Lichtintensität bis zu dem Punkt auszusetzen, an dem die Photosyntheserate gegenüber der Lichtintensität maximal wäre, ist aufgrund von Photostress bei dünnen Zelldichten und bei dichten Zelldichten wegen der selbstschattigen Wirkung von Zellen schwer zu erreichen. Es hängt von der Kulturtiefe, der Biomassekonzentration und den Mischratenparametern ab, die alle durch den Typ des Photobioreaktors bestimmt werden.

Untersuchungen zur photobiochemischen Aktivitäten unterschiedlicher Zelldichten von *Chlorella* zwischen 1 und 47 g L⁻¹ wurden von Masojídek et al. (2011) durchgeführt. Dabei ergaben die Ergebnisse, dass verdünnte Kulturen (1-2 g L⁻¹ TS) einen signifikanten Photostress aufgrund der Hemmung des Elektronentransports im PSII-Komplex aufwiesen. Die höchsten photochemischen Aktivitäten wurden in Kulturen von 6,5-12,5 g L⁻¹ erreicht. Ebenfalls bei den Untersuchungen von Hindersin et al. (2013) trat bei einer Biomassekonzentrationen unter 1,1 g L⁻¹ TS eine Photoinhibition auf.

Fazit & Ausblick

In dieser Arbeit wurden Hinweise und Methodiken gesucht, um das ALBA-Kläranlagen-System effizienter zu steuern. Dabei leisteten alle drei Hauptthemen, die Charakterisierung der mikrobiellen Zusammensetzung der ALBA-Flocken und die Flockenstabilität, die Entwicklung einer Methode zur Quantifizierung von Algen- und Bakterienanteil aus ALBA-Flocken sowie die Sauerstoffdynamik Beiträge zur Optimierung des Systems. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Reinigung von Papierfabrikabwasser mittels ALBA-Flocken ohne externe Belüftung sowohl im Labor als auch im Pilotmaßstab möglich ist.

Die Populationsstruktur wurde über DGGE und Hochdurchsatzsequenzierung untersucht. Beide Ansätze zeigten, dass die Ergebnisse miteinander korrelierten. Die Zusammensetzung der Mikroorganismen wurde durch viele verschiedene biotische und abiotische Faktoren geprägt, jedoch innerhalb des Versuchszeitraums von 15 Wochen hatten diese Veränderungen offenbar keinen negativen Einfluss auf die Reinigungsleistung der Anlage. Bei der Hochdurchsatzsequenzierung bestehen weitere Möglichkeiten für die Auswertung, jedoch sind diese aufwendiger und kostenintensiver. Die Auswertung ist nur so gut, wie die verwendete Sequenzdatenbank.

Zusammenfassend ergeben die vorliegenden generierten Daten einen detaillierten Einblick in die mikrobielle Gemeinschaft und den putativen bakteriellen Stoffwechsellleistungen eines ALBA-Systems. Zudem stützen die geringfügigen Änderungen der Konzentrationen der einzelnen EPS Komponenten in den ALBA-Flocken und die schnelle Inkorporation der freien

Chlorella vulgaris-Zellen mit dem Belebtschlamm eine fortlaufende Stabilität der Flocken innerhalb der 15 Versuchswochen.

Die ermittelten Daten zur Optimierung von Kultivierungsbedingungen der Mikroalgen im ALBA-Reinigungssystem, wie die maximale Sauerstoffproduktionsrate, der Lichtsättigungspunkt oder die maximale Elektronentransportrate können genutzt werden, um die Produktivität der Mikroalgen und des Mikroalgen-Bakterien-Konsortiums in der Abwasserreinigung zu verbessern.

Die entwickelte schonende Desintegrationsmethode, wie auch die photometrische Methode zur Quantifizierung der Konzentrationen Algen und Bakterien in ALBA-Flocken aus der Abwasserreinigung zur Überwachung der Verhältnisse, erzielte sehr gute Ergebnisse bei dem Einsatz von *C. vulgaris*. Weiterhin sollte untersucht werden, ob der Desintegrationsgrad und die Quantifizierungsmethode bei anderen Mikroalgen oder gar Mischkulturen von Mikroalgen mit Bakterien ähnliche Ergebnisse erzielen.

Die entwickelte Quantifizierungsmethode könnte auch in Bereichen außerhalb der Abwasserreinigung Einsatz finden, wo Kontamination mit Bakterien entdeckt und quantifiziert werden, beispielsweise bei der Kultivierung von Mikroalgen zur Gewinnung von Biokraftstoffen, Lebens- und Futtermitteln.

6. Literaturverzeichnis

- Addison SL, Foote SM, Reid NM, Lloyd-Jones G (2007) *Novosphingobium nitrogenifigens* sp. nov., a polyhydroxyalkanoate-accumulating diazotroph isolated from a New Zealand pulp and paper wastewater. *Int J Syst Evol Micr* 57:2467
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer K-H (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews* 59:143-169
- Ammary BY (2004) Nutrients requirements in biological industrial wastewater treatment. *African Journal of Biotechnology* 3:236-238
- Ashrafi O, Yerushalmi L, Haghghat F (2015) Wastewater treatment in the pulp-and-paper industry: A review of treatment processes and the associated greenhouse gas emission. *J Environ Manage* 158:146-157 doi:10.1016/j.jenvman.2015.05.010
- Barnes JD, Balaguer L, Manrique E, Elvira S, Davison AW (1992) A Reappraisal of the Use of DmsO for the Extraction and Determination of Chlorophylls-a and Chlorophylls-B in Lichens and Higher-Plants. *Environ Exp Bot* 32:85-100 doi:Doi 10.1016/0098-8472(92)90034-Y
- Bernardet J-F, Nakagawa Y (2006) An introduction to the family Flavobacteriaceae. In: *The prokaryotes*. Springer, pp 455-480
- Bhola V, Desikan R, Santosh SK, Subburamu K, Sanniyasi E, Bux F (2011) Effects of parameters affecting biomass yield and thermal behaviour of *Chlorella vulgaris*. *J Biosci Bioeng* 111:377-382 doi:10.1016/j.jbiosc.2010.11.006
- Boon N, De Windt W, Verstraete W, Top EM (2002) Evaluation of nested PCR–DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. *Fems Microbiol Ecol* 39:101-112
- Brennan L, Owende P (2010) Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew Sust Energ Rev* 14:557-577 doi:10.1016/j.rser.2009.10.009
- Brinkhoff T, Bach G, Heidorn T, Liang L, Schlingloff A, Simon M (2004) Antibiotic production by a *Roseobacter* clade-affiliated species from the German Wadden Sea and its antagonistic effects on indigenous isolates. *Appl Environ Microb* 70:2560-2565
- Bruhn JB, Gram L, Belas R (2007) Production of antibacterial compounds and biofilm formation by *Roseobacter* species are influenced by culture conditions. *Appl Environ Microb* 73:442-450
- Bruhn JB, Nielsen KF, Hjelm M, Hansen M, Bresciani J, Schulz S, Gram L (2005) Ecology, inhibitory activity, and morphogenesis of a marine antagonistic bacterium belonging to the *Roseobacter* clade. *Appl Environ Microb* 71:7263-7270
- Campbell BJ, Engel AS, Porter ML, Takai K (2006) The versatile ϵ -proteobacteria: key players in sulphidic habitats. *Nature Reviews Microbiology* 4:458-468
- Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, Fierer N, Knight R (2011) Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108:4516-4522
- Carney LT, Reinsch SS, Lane PD, Solberg OD, Jansen LS, Williams KP, Trent JD, Lane TW (2014) Microbiome analysis of a microalgal mass culture growing in municipal wastewater in a prototype OMEGA photobioreactor. *Algal Research* 4:52-61
- Chen C-Y, Yeh K-L, Aisyah R, Lee D-J, Chang J-S (2011) Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. *Bioresource Technol* 102:71-81
- Chisti Y (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv* 25:294-306 doi:10.1016/j.biotechadv.2007.02.001
- Chisti Y, Mooyoung M (1986) Disruption of Microbial-Cells for Intracellular Products. *Enzyme Microb Tech* 8:194-204 doi:Doi 10.1016/0141-0229(86)90087-6
-

-
- Chiu SY, Kao CY, Chen TY, Chang YB, Kuo CM, Lin CS (2015) Cultivation of microalgal *Chlorella* for biomass and lipid production using wastewater as nutrient resource. *Bioresour Technol* 184:179-189 doi:DOI 10.1016/j.biortech.2014.11.080
- Chrost R (1983) Plankton photosynthesis, extracellular release and bacterial utilization of released dissolved organic carbon(RDOC) in lakes of different trophic. *Acta Microbiol Pol* 32:275-287
- Cole JJ (1982) Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics* 13:291-314
- Colwell R, Brayton P, Grimes D, Roszak D, Huq S, Palmer L (1985) Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered microorganisms. *Nature biotechnology* 3:817-820
- Comte S, Guibaud G, Baudu M (2006) Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and EPS complexation properties Part I. Comparison of the efficiency of eight EPS extraction methods. *Enzyme Microb Tech* 38:237-245 doi:10.1016/j.enzmictec.2005.06.016
- Croft MT, Warren MJ, Smith AG (2006) Algae need their vitamins. *Eukaryotic cell* 5:1175-1183
- Cromar NJ, Fallowfield HJ (1992) Separation of Components of the Biomass from High-Rate Algal Ponds Using Percoll(R) Density Gradient Centrifugation. *J Appl Phycol* 4:157-163 doi:Doi 10.1007/Bf02442464
- Cromar NJ, Fallowfield HJ (2003) Use of image analysis to determine algal and bacterial biomass in a high rate algal pond following Percoll (R) fractionation. *Water Sci Technol* 48:53-60
- Dantas G, Sommer MO, Oluwasegun RD, Church GM (2008) Bacteria subsisting on antibiotics. *Science* 320:100-103
- De Gannes V, Eudoxie G, Bekele I, Hickey WJ (2015) Relations of microbiome characteristics to edaphic properties of tropical soils from Trinidad. *Front Microbiol* 6:1045
- Dignac MF, Urbain V, Rybacki D, Bruchet A, Snidaro D, Scribe P (1998) Chemical description of extracellular polymers: Implication on activated sludge floc structure. *Water Sci Technol* 38:45-53 doi:Doi 10.1016/S0273-1223(98)00676-3
- Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS (1991) Touchdown Pcr to Circumvent Spurious Priming during Gene Amplification. *Nucleic Acids Res* 19:4008-4008 doi:DOI 10.1093/nar/19.14.4008
- Doucha J, Livansky K (2008) Influence of processing parameters on disintegration of *Chlorella* cells in various types of homogenizers. *Appl Microbiol Biot* 81:431-440 doi:10.1007/s00253-008-1660-6
- Doucha J, Lívanský K (2006) Productivity, CO₂/O₂ exchange and hydraulics in outdoor open high density microalgal (*Chlorella* sp.) photobioreactors operated in a Middle and Southern European climate. *J Appl Phycol* 18:811-826
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal Chem* 28:350-356 doi:DOI 10.1021/ac60111a017
- Edwards JL, Smith DL, Connolly J, McDonald JE, Cox MJ, Joint I, Edwards C, McCarthy AJ (2010) Identification of Carbohydrate Metabolism Genes in the Metagenome of a Marine Biofilm Community Shown to Be Dominated by Gammaproteobacteria and Bacteroidetes. *Genes-Basel* 1:371-384 doi:10.3390/genes1030371
- Eikelboom DH, Van Buijsen H (1983) Microscopic sludge investigation manual. TNO,
- Feng QQ, Han L, Nogi YC, Hong Q, Lv J (2016) *Flavobacterium lutivivi* sp nov., isolated from activated sludge. *Int J Syst Evol Micr* 66:1394-1400 doi:10.1099/ijsem.0.000892
- Field CB, Behrenfeld MJ, Randerson JT, Falkowski P (1998) Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science* 281:237-240
- Fischer SG, Lerman LS (1983) DNA Fragments Differing by Single Base-Pair Substitutions Are Separated in Denaturing Gradient Gels - Correspondence with Melting Theory. *P Natl Acad Sci-Biol* 80:1579-1583 doi:DOI 10.1073/pnas.80.6.1579
-

-
- Flemming H-C, Wingender J (2010) The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 8:623-633
- Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ (2007) The EPS matrix: The "House of Biofilm cells". *J Bacteriol* 189:7945-7947 doi:10.1128/Jb.00858-07
- Flemming HC, Wingender J (2002) What biofilms contain - Proteins, polysaccharides, etc. *Chem Unserer Zeit* 36:30-42 doi:Doi 10.1002/1521-3781(200202)36:1<30::Aid-Ciuz30>3.0.Co;2-O
- Frølund B, Palmgren R, Keiding K, Nielsen PH (1996) Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Res* 30:1749-1758 doi:Doi 10.1016/0043-1354(95)00323-1
- Gao B, Mohan R, Gupta RS (2009) Phylogenomics and protein signatures elucidating the evolutionary relationships among the Gammaproteobacteria. *Int J Syst Evol Micr* 59:234-247 doi:10.1099/ijs.0.002741-0
- Gilbert M, Wilhelm C, Richter M (2000) Bio-optical modelling of oxygen evolution using in vivo fluorescence: Comparison of measured and calculated photosynthesis/irradiance (P-I) curves in four representative phytoplankton species. *J Plant Physiol* 157:307-314
- Gonzalez LE, Bashan Y (2000) Increased Growth of the Microalga *Chlorella vulgaris* when Coimmobilized and Cocultured in Alginate Beads with the Plant-Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl Environ Microb* 66:1527-1531
- Green DH, Llewellyn LE, Negri AP, Blackburn SI, Bolch CJ (2004) Phylogenetic and functional diversity of the cultivable bacterial community associated with the paralytic shellfish poisoning dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Fems Microbiol Ecol* 47:345-357
- Guibaud G, Bordas F, Saaid A, D'abzac P, Van Hullebusch E (2008) Effect of pH on cadmium and lead binding by extracellular polymeric substances (EPS) extracted from environmental bacterial strains. *Colloid Surface B* 63:48-54 doi:10.1016/j.colsurfb.2007.11.002
- Guiyousse B, Borde X, Munoz R, Hatti-Kaul R, Nugier-Chauvin C, Patin H, Mattiasson B (2002) Influence of the initial composition of algal-bacterial microcosms on the degradation of salicylate in a fed-batch culture. *Biotechnol Lett* 24:531-538 doi:Doi 10.1023/A:1014847616212
- Guo Z, Tong YW (2014) The interactions between *Chlorella vulgaris* and algal symbiotic bacteria under photoautotrophic and photoheterotrophic conditions. *J Appl Phycol* 26:1483-1492
- Gutzeit G, Lorch D, Weber A, Engels M, Neis U (2005) Biofloculent algal-bacterial biomass improves low-cost wastewater treatment. *Water Sci Technol* 52:9-18
- Halim R, Rupasinghe TWT, Tull DL, Webley PA (2013) Mechanical cell disruption for lipid extraction from microalgal biomass. *Bioresource Technol* 140:53-63 doi:10.1016/j.biortech.2013.04.067
- Hanelt D, Nultsch W (1995) Field Studies of Photoinhibition Show Non-Correlations between Oxygen and Fluorescence Measurements in the Arctic Red-Alga *Palmaria-Palmata*. *J Plant Physiol* 145:31-38
- Hara A, Radin NS (1978) Lipid Extraction of Tissues with a Low-Toxicity Solvent. *Anal Biochem* 90:420-426 doi:Doi 10.1016/0003-2697(78)90046-5
- Hiraishi A, Morishima Y, Kitamura H (1991) Use of isoprenoid quinone profiles to study the bacterial community structure and population dynamics in the photosynthetic sludge system. *Water Sci Technol* 23:937-945
- Janczyk P, Franke H, Souffrant WB (2007) Nutritional value of *Chlorella vulgaris*: Effects of ultrasonication and electroporation on digestibility in rats. *Anim Feed Sci Tech* 132:163-169 doi:DOI 10.1016/j.anifeedsci.2006.03.007
- Jassby AD, Platt T (1976) Mathematical formulation of the relationship between photosynthesis and light for phytoplankton. *J Limnol Oceanogr* 21:540-547
-

-
- Jiménez C, Cossí BR, Niell FX (2003) Relationship between physicochemical variables and productivity in open ponds for the production of *Spirulina*: a predictive model of algal yield. *Aquaculture* 221:331-345
- Joyce EM, King PM, Mason TJ (2014) The effect of ultrasound on the growth and viability of microalgae cells. *J Appl Phycol* 26:1741-1748 doi:DOI 10.1007/s10811-013-0202-5
- Ju F, Guo F, Ye L, Xia Y, Zhang T (2014) Metagenomic analysis on seasonal microbial variations of activated sludge from a full-scale wastewater treatment plant over 4 years. *Environmental microbiology reports* 6:80-89
- Jung H, Kappen J, Hesse A, Götz B (2014) Verband Deutscher Papierfabriken e. V. (VDP) Wasserumfrage 2013 vol 09.
- Kämpfer P, Schulze R, Jäckel U, Malik KA, Amann R, Spring S (2005) *Hydrogenophaga defluvii* sp. nov. and *Hydrogenophaga atypica* sp. nov., isolated from activated sludge. *Int J Syst Evol Micr* 55:341-344
- Kämpfer P, Witzemberger R, Denner EB, Busse H-J, Neef A (2002) *Novosphingobium hassiacum* sp. nov., a new species isolated from an aerated sewage pond. *Systematic and applied microbiology* 25:37-45
- Kanagawa T, Kamagata Y, Aruga S, Kohno T, Horn M, Wagner M (2000) Phylogenetic analysis of and oligonucleotide probe development for Eikelboom type 021N filamentous bacteria isolated from bulking activated sludge. *Appl Environ Microb* 66:5043-5052
- Kerstens K, De Vos P, Gillis M, Swings J, Vandamme P, Stackebrandt E (2006) Introduction to the Proteobacteria. In: *The prokaryotes*. Springer, pp 3-37
- Kessler E, Czygan FC (1970) Physiologische und biochemische Beiträge zur Taxonomie der Gattung *Chlorella* IV. Verwertung organischer Stickstoffverbindungen. *Arch Mikrobiol*, 70:211--216
- Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, Glockner FO (2013) Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res* 41 doi:ARTN e1 10.1093/nar/gks808
- Korbie DJ, Mattick JS (2008) Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat Protoc* 3:1452-1456 doi:10.1038/nprot.2008.133
- Krohn-Molt I et al. (2013) Metagenome Survey of a Multispecies and Alga-Associated Biofilm Revealed Key Elements of Bacterial-Algal Interactions in Photobioreactors. *Appl Environ Microb* 79:6196-6206 doi:Doi 10.1128/Aem.01641-13
- Kusar D, Avgustin G (2012) Optimization of the DGGE band identification method. *Folia Microbiol* 57:301-306 doi:10.1007/s12223-012-0130-9
- Lau PS, Tam NFY, Wong YS (1995) Effect of Algal Density on Nutrient Removal from Primary Settled Waste-Water. *Environ Pollut* 89:59-66 doi:10.1016/0269-7491(94)00044-E
- Lei XD et al. (2015) *Phaeodactylibacter luteus* sp nov., isolated from the oleaginous microalga *Picochlorum* sp. *Int J Syst Evol Micr* 65:2666-2670 doi:10.1099/ijs.0.000321
- Lessa EP, Applebaum G (1993) Screening Techniques for Detecting Allelic Variation in DNA-Sequences. *Mol Ecol* 2:119-129 doi:DOI 10.1111/j.1365-294X.1993.tb00006.x
- Leupold M, Hindersin S, Gust G, Kerner M, Hanelt D (2013) Influence of mixing and shear stress on *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*, and *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Appl Phycol* 25:485-495
- Lewin A, Wentzel A, Valla S (2013) Metagenomics of microbial life in extreme temperature environments. *Current opinion in biotechnology* 24:516-525
- Li L, Mendis N, Trigui H, Oliver JD, Faucher SP (2014) The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens.
- Liang Y, Sarkany N, Cui Y (2009) Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnol Lett* 31:1043-1049
-

-
- Liu H, Fang HHP (2002) Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *J Biotechnol* 95:249-256 doi:10.1016/S0168-1656(02)00025-1 Pii S0168-1656(02)00025-1
- Lorenz RT, Cysewski GR (2000) Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends Biotechnol* 18:160-167
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
- Ma L, Jackson KD, Landry RM, Parsek MR, Wozniak DJ (2006) Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* conditional Psl variants reveals roles for the Psl polysaccharide in adhesion and maintaining biofilm structure postattachment. *J Bacteriol* 188:8213-8221 doi:10.1128/Jb.01202-06
- MacLean D, Jones JD, Studholme DJ (2009) Application of 'next-generation' sequencing technologies to microbial genetics. *Nature Reviews Microbiology* 7:287-296
- Macur RE, Wheeler JT, McDermott TR, Inskeep WP (2001) Microbial populations associated with the reduction and enhanced mobilization of arsenic in mine tailings. *Environ Sci Technol* 35:3676-3682
- Manheim D, Nelson Y (2013) Settling and Bioflocculation of Two Species of Algae Used in Wastewater Treatment and Algae Biomass Production. *Environ Prog Sustain* 32:946-954 doi:10.1002/ep.11861
- Medina M, Neis U (2007) Symbiotic algal bacterial wastewater treatment: effect of food to microorganism ratio and hydraulic retention time on the process performance. *Water Sci Technol* 55:165-171 doi:10.2166/Wst.2007.351
- Mehta S, Gaur J (2005) Use of algae for removing heavy metal ions from wastewater: progress and prospects. *Critical reviews in biotechnology* 25:113-152
- Mehta SK, Gaur JP (2001) Characterization and optimization of Ni and Cu sorption from aqueous solution by *Chlorella vulgaris*. *Ecol Eng* 18:1-13
- Mendoza JL, Granados MR, de Godos I, Acien FG, Molina E, Heaven S, Banks CJ (2013) Oxygen transfer and evolution in microalgal culture in open raceways. *Bioresource Technol* 137:188-195 doi:10.1016/j.biortech.2013.03.127
- Mouget JL, Dakhama A, Lavoie MC, Delanoue J (1995) Algal Growth Enhancement by Bacteria - Is Consumption of Photosynthetic Oxygen Involved. *Fems Microbiol Ecol* 18:35-43 doi:Doi 10.1016/0168-6496(95)00038-C
- Munoz R, Guieysse B (2006) Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. *Water Res* 40:2799-2815 doi:10.1016/j.watres.2006.06.011
- Muyzer G, Dewaal EC, Uitterlinden AG (1993) Profiling of Complex Microbial-Populations by Denaturing Gradient Gel-Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes-Coding for 16s Ribosomal-Rna. *Appl Environ Microb* 59:695-700
- 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* 73:127-141 doi:Doi 10.1023/A:1000669317571
- Muyzer G, Teske A, Wirsén CO, Jannasch HW (1995) Phylogenetic-Relationships of *Thiomicrospira* Species and Their Identification in Deep-Sea Hydrothermal Vent Samples by Denaturing Gradient Gel-Electrophoresis of 16s Rdna Fragments. *Arch Microbiol* 164:165-172 doi:Doi 10.1007/Bf02529967
- Nagashima S, Kamimura A, Shimizu T, Nakamura-Isaki S, Aono E, Sakamoto K, Ichikawa N, Nakazawa H, Sekine M, Yamazaki S (2012) Complete genome sequence of phototrophic betaproteobacterium *Rubrivivax gelatinosus* IL144. *J Bacteriol* 194:3541-3542
- Noda K, Ohno N, Tanaka K, Kamiya N, Okuda M, Yadomae T, Nomoto K, Shoyama Y (1996) A water-soluble antitumor glycoprotein from *Chlorella vulgaris*. *Planta Med* 62:423-426 doi:DOI 10.1055/s-2006-957931
- Nubel U, Engelen B, Felske A, Snaidr J, Wieshuber A, Amann RI, Ludwig W, Backhaus H (1996) Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus*
-

-
- polymyxin detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J Bacteriol* 178:5636-5643
- Oswald WJ (1995) Ponds in the 21st Century. *Water Sci Technol* 31:1-8 doi:10.1016/0273-1223(95)00487-8
- Oswald WJ, Gotaas HB, Golueke CG, Kellen WR (1957) Algae in Waste Treatment. *Sewage Ind Wastes* 29:437-455
- Pan XL, Liu J, Zhang DY, Chen X, Li LH, Song WJ, Yang JY (2010) A comparison of five extraction methods for extracellular polymeric substances (EPS) from biofilm by using three-dimensional excitation-emission matrix (3DEEM) fluorescence spectroscopy. *Water Sa* 36:111-116
- Park JY, Lee K, Choi SA, Jeong MJ, Kim B, Lee JS, Oh YK (2015) Sonication-assisted homogenization system for improved lipid extraction from *Chlorella vulgaris*. *Renew Energ* 79:3-8 doi:10.1016/j.renene.2014.10.001
- Park KY, Kweon J, Chantrasakdakul P, Lee K, Cha HY (2013) Anaerobic digestion of microalgal biomass with ultrasonic disintegration. *Int Biodeter Biodegr* 85:598-602 doi:10.1016/j.ibiod.2013.03.035
- Passos F, Hernandez-Marine M, Garcia J, Ferrer I (2014) Long-term anaerobic digestion of microalgae grown in HRAP for wastewater treatment. Effect of microwave pretreatment. *Water Res* 49:351-359 doi:10.1016/j.watres.2013.10.013
- Pell L, Löhn S, Weinberger G, Kuchta K, Hanelt D (2016) Mild disintegration methods of microalgae–bacteria flocs from wastewater treatment. *J Appl Phycol*:1-9 doi:10.1007/s10811-016-0978-1
- Pérez-Pantoja D, Donoso R, Agulló L, Córdova M, Seeger M, Pieper DH, González B (2012) Genomic analysis of the potential for aromatic compounds biodegradation in Burkholderiales. *Environmental microbiology* 14:1091-1117
- Pratt R, Daniels T, Eiler JJ, Gunnison J, Kumler W, Oneto JF, Strait LA, Spoehr H, Hardin G, Milner H (1944) Chlorellin, an Antibacterial Substance from *Chlorella*. *Science (Washington)*:351-352
- Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464:59-65
- Rai L, Mallick N (1992) Removal and assessment of toxicity of Cu and Fe to *Anabaena doliolum* and *Chlorella vulgaris* using free and immobilized cells. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 8:110-114
- Rajasekhar P, Fan LH, Nguyen T, Roddick FA (2012) Impact of sonication at 20 kHz on *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena circinalis* and *Chlorella* sp. *Water Res* 46:1473-1481 doi:10.1016/j.watres.2011.11.017
- Reichenbach H (2006) The order cytophagales. In: *The prokaryotes*. Springer, pp 549-590
- Robinson PK, Wilkinson SC (1994) Removal of aqueous mercury and phosphate by gel-entrapped *Chlorella* in packed-bed reactors. *Enzyme Microb Tech* 16:802-807
- Röske I, Sabra W, Nacke H, Daniel R, Zeng AP, Antranikian G, Sahm K (2014) Microbial community composition and dynamics in high-temperature biogas reactors using industrial bioethanol waste as substrate. *Appl Microbiol Biot* 98:9095-9106 doi:10.1007/s00253-014-5906-1
- Ryu SH, Park M, Jeon Y, Lee JR, Park W, Jeon CO (2007) *Flavobacterium filum* sp. nov., isolated from a wastewater treatment plant in Korea. *Int J Syst Evol Micr* 57:2026-2030 doi:10.1099/ijs.0.65138-0
- Sahm K, John P, Nacke H, Wemheuer B, Grote R, Daniel R, Antranikian G (2013) High abundance of heterotrophic prokaryotes in hydrothermal springs of the Azores as revealed by a network of 16S rRNA gene-based methods. *Extremophiles* 17:649-662
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual* 3rd edition. ColdSpring-Harbour Laboratory Press, UK.
- Sandau E, Sandau P, Pulz O (1996) Heavy metal sorption by microalgae. *Acta Biotechnologica* 16:227-235
-

-
- Sarrafzadeh MH, La HJ, Seo SH, Asgharnejad H, Oh HM (2015) Evaluation of various techniques for microalgal biomass quantification. *J Biotechnol* 216:90-97 doi:10.1016/j.jbiotec.2015.10.010
- Schulz H, Brinkhoff T, Ferdelman T, Mariné MH, Teske A, Jørgensen B (1999) Dense populations of a giant sulfur bacterium in Namibian shelf sediments. *Science* 284:493-495
- Schumacher G, Blume T, Sekoulov I (2003) Bacteria reduction and nutrient removal in small wastewater treatment plants by an algal biofilm. *Water Sci Technol* 47:195-202
- Sekiguchi H, Tomioka N, Nakahara T, Uchiyama H (2001) A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Biotechnol Lett* 23:1205-1208 doi:Doi 10.1023/A:1010517117046
- Sezgin M, Jenkins D, Parker DS (1978) A unified theory of filamentous activated sludge bulking. *Journal (Water Pollution Control Federation)*:362-381
- Shriwastav A, Mohamed J, Bose P, Shekhar M (2015) Deconvoluting algal and bacterial biomass concentrations in algal-bacterial suspensions. *J Appl Phycol* 27:211-222 doi:DOI 10.1007/s10811-014-0302-x
- Simpson JM, McCracken VJ, White BA, Gaskins HR, Mackie RI (1999) Application of denaturant gradient gel electrophoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota. *J Microbiol Meth* 36:167-179 doi:Doi 10.1016/S0167-7012(99)00029-9
- Slade AH, Ellis RJ, vanden Heuvel M, Stuthridge TR (2004) Nutrient minimisation in the pulp and paper industry: an overview. *Water Sci Technol* 50:111-122
- Sponza DT (2003) Investigation of extracellular polymer substances (EPS) and physicochemical properties of different activated sludge flocs under steady-state conditions. *Enzyme Microb Tech* 32:375-385 doi:10.1016/S0141-0229(02)00309-5
- Stackebrandt E, Murray R, Trüper H (1988) Proteobacteria classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the "purple bacteria and their relatives". *Int J Syst Evol Micr* 38:321-325
- Steele HL, Streit WR (2005) Metagenomics: advances in ecology and biotechnology. *Fems Microbiol Lett* 247:105-111
- Steinbrecher T (2016) Etablierung und Anwendung einer Quantifizierungsmethode für Mischproben aus Algen- und Bakterienflocken.
- Stockenreiter M, Graber A-K, Haupt F, Stibor H (2012) The effect of species diversity on lipid production by micro-algal communities. *J Appl Phycol* 24:45-54
- Strabala TJ, Macdonald L, Liu V, Smit A-M (2012) Draft genome sequence of *Novosphingobium nitrogenifigens* Y88T. *J Bacteriol* 194:201-201
- Su YY, Mennerich A, Urban B (2011) Municipal wastewater treatment and biomass accumulation with a wastewater-born and settleable algal-bacterial culture. *Water Res* 45:3351-3358 doi:DOI 10.1016/j.watres.2011.03.046
- Su YY, Mennerich A, Urban B (2012a) Comparison of nutrient removal capacity and biomass settleability of four high-potential microalgal species. *Bioresource Technol* 124:157-162 doi:10.1016/j.biortech.2012.08.037
- Su YY, Mennerich A, Urban B (2012b) Coupled nutrient removal and biomass production with mixed algal culture: Impact of biotic and abiotic factors. *Bioresource Technol* 118:469-476 doi:10.1016/j.biortech.2012.05.093
- Su YY, Mennerich A, Urban B (2012c) Synergistic cooperation between wastewater-born algae and activated sludge for wastewater treatment: Influence of algae and sludge inoculation ratios. *Bioresource Technol* 105:67-73 doi:10.1016/j.biortech.2011.11.113
- Sun DL, Jiang X, Wu QLL, Zhou NY (2013) Intragenomic Heterogeneity of 16S rRNA Genes Causes Overestimation of Prokaryotic Diversity. *Appl Environ Microb* 79:5962-5969 doi:10.1128/Aem.01282-13
- Sutherland IW (2001) Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiol-Uk* 147:3-9
- Suzuki D, Ueki A, Amaishi A, Ueki K (2007) *Desulfopila aestuarii* gen. nov., sp. nov., a Gram-negative, rod-like, sulfate-reducing bacterium isolated from an estuarine sediment in Japan. *Int J Syst Evol Micr* 57:520-526
-

-
- Suzuki MT, Giovannoni SJ (1996) Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl Environ Microb* 62:625-630
- Takeuchi M, Hamana K, Hiraishi A (2001) Proposal of the genus *Sphingomonas* sensu stricto and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. *Int J Syst Evol Micr* 51:1405-1417
- Tarlan E, Dilek FB, Yetis U (2002) Effectiveness of algae in the treatment of a wood-based pulp and paper industry wastewater. *Bioresour Technol* 84:1-5 doi:Pii S0960-8524(02)00029-9
Doi 10.1016/S0960-8524(02)00029-9
- Thomas F, Hehemann JH, Rebuffet E, Czjzek M, Michel G (2011) Environmental and gut Bacteroidetes: the food connection. *Front Microbiol* 2 doi:ARTN 93
10.3389/fmicb.2011.00093
- Usha MT, Chandra TS, Sarada R, Chauhan VS (2016) Removal of nutrients and organic pollution load from pulp and paper mill effluent by microalgae in outdoor open pond. *Bioresour Technol* 214:856-860 doi:10.1016/j.biortech.2016.04.060
- Van den Hende S, Beelen V, Bore G, Boon N, Vervaeren H (2014a) Up-scaling aquaculture wastewater treatment by microalgal bacterial flocs: From lab reactors to an outdoor raceway pond. *Bioresour Technol* 159:342-354 doi:10.1016/j.biortech.2014.02.113
- Van den Hende S, Carre E, Cocaud E, Beelen V, Boon N, Vervaeren H (2014b) Treatment of industrial wastewaters by microalgal bacterial flocs in sequencing batch reactors. *Bioresour Technol* 161:245-254 doi:10.1016/j.biortech.2014.03.057
- van Hannen EJ, van Agterveld MP, Gons HJ, Laanbroek HJ (1998) Revealing genetic diversity of eukaryotic microorganisms in aquatic environments by denaturing gradient gel electrophoresis. *J Phycol* 34:206-213 doi:DOI 10.1046/j.1529-8817.1998.340206.x
- Van Veen W, Van Der Kooij D, Geuze EC, Van der Vlies A (1973) Investigations on the sheathed bacterium *Haliscomenobacter hydrossis* gen. n., sp. n., isolated from activated sludge. *Antonie van Leeuwenhoek* 39:207-216
- Wanner J (1994) The implementation of bulking control in the design of activated sludge systems. *Water Sci Technol* 29:193-202
- 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* 51:187-196
- Waterfield NR, Ciche T, Clarke D (2009) *Photothabdus* and a host of hosts. *Annual review of microbiology* 63:557-574
- Weinberger G, Bienert C, Pell L, Wieczorek N, Kuchta K, Zimmermann B, Vreuls C, Wilmot A, Pesoutova R, Hlavinek P (2015) Algae-Bacteria operation processes for waste water treatment and biomass production. PTS, Germany, http://www.cornet-albapro.eu/fileadmin/PTS/ALBAPRO/Dokumente/ALBAPRO_Final%20report.pdf
- Weinberger G, Hentschke C, Neis U, Ergünel A, Pereira A (2012) Combined Algal and Bacterial waste water treatment for high environmental QUALITY effluents (ALBAQUA). PTS, Germany, http://www.ptspaper.de/fileadmin/PTS/PTSPAPER/06_Forschung/Dokumente/Forschungsprojekte/EU_ALBAQUA.pdf
- Weissman JC, Goebel RP, Benemann JR (1988) Photobioreactor design: mixing, carbon utilization, and oxygen accumulation. *Biotechnol Bioeng* 31:336-344
- Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS (2002) Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 295:1487-1487 doi:DOI 10.1126/science.295.5559.1487
- Wieczorek N, Kucuker MA, Kuchta K (2015) Microalgae-bacteria flocs (MaB-Flocs) as a substrate for fermentative biogas production. *Bioresour Technol* 194:130-136 doi:10.1016/j.biortech.2015.06.104
- Williams KP, Gillespie JJ, Sobral BWS, Nordberg EK, Snyder EE, Shallom JM, Dickerman AW (2010) Phylogeny of Gammaproteobacteria. *J Bacteriol* 192:2305-2314 doi:10.1128/Jb.01480-09
-

-
- Williams KP, Sobral BW, Dickerman AW (2007) A robust species tree for the alphaproteobacteria. *J Bacteriol* 189:4578-4586
- Wingender J, Strathmann M, Rode A, Leis A, Flemming HC (2001) Isolation and biochemical characterization of extracellular polymeric substances from *Pseudomonas aeruginosa*. *Method Enzymol* 336:302-314 doi:Doi 10.1016/S0076-6879(01)36597-7
- Woese C, Weisburg W, Hahn C, Paster B, Zablen L, Lewis B, Macke T, Ludwig W, Stackebrandt E (1985) The phylogeny of purple bacteria: the gamma subdivision. *Systematic and Applied Microbiology* 6:25-33
- Xia Y, Kong YH, Thomsen TR, Nielsen PH (2008) Identification and ecophysiological characterization of epiphytic protein-hydrolyzing Saprospiraceae ("Candidatus epiflobacter" spp.) in activated sludge. *Appl Environ Microb* 74:2229-2238 doi:10.1128/Aem.02502-07
- Xiao R, Zheng Y (2016) Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. *Biotechnol Adv* 34:1225-1244 doi:10.1016/j.biotechadv.2016.08.004
- Yabuuchi E, Kosako Y (2005) Sphingomonas. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*
- Yu XC, Dong T, Zheng YB, Miao C, Chen SL (2015) Investigations on cell disruption of oleaginous microorganisms: Hydrochloric acid digestion is an effective method for lipid extraction. *Eur J Lipid Sci Tech* 117:730-737 doi:10.1002/ejlt.201400195
- Zhang L, Yuhua S, Dalei G, Zirong W, Jiang D (2012) Molecular diversity of bacterial community of dye wastewater in an anaerobic sequencing batch reactor. *African Journal of Microbiology Research* 6:6444-6453

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Wechselwirkung zwischen Mikroalgen und heterotrophen Mikroorganismen im Abwasser.	6
Abb. 2: Versuchsaufbau der Abwasserreinigung mittels Algen-Bakterien-Flocken im 2 L Reaktor mit nicht invasiver O ₂ -Überwachung.....	16
Abb. 3: Versuchsaufbau der Pilotanlage zur Reinigung von Papierfabrikabwasser mittels Mikroalgen-Bakterien-Flocken	17
Abb. 4: Aufnahme des Kultivierungsbeckens und des 800 L Reaktors	17
Abb. 5: Prinzip der dynamischen Kollisionslöschung durch molekularen Sauerstoff.	24
Abb. 6: Ablauf zur quantitativen Bestimmung des Desintegrationsgrades.	28
Abb. 7: Kalibriergerade zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen, sauren Polysacchariden und von neutralen Polysacchariden.....	32
Abb. 8: Erstellter Korrelationsfaktor zwischen der Extinktion und der Trockensubstanz bei <i>Chlorella vulgaris</i>	35
Abb. 9: Überwachung der Konzentrationen von Ammonium, Phosphat, Nitrit, Nitrat, Chlorid, Sulfat, KBE und des TS-Gehalts sowie des CSB-Gehalts und CSB-Abbaugrades im 2 L-Bioreaktor über einen Versuchszeitraum von 13 Tagen.	40
Abb. 10: Übersicht des Biopolymergehaltes der EPS aus der Abwasserreinigung im 2 L-Bioreaktor in einem zeitlichen Verlauf von 13 Tagen.	42
Abb. 11: Verlauf der Sauerstoffkonzentration im Medium des Repeated-Fed-Batch Verfahrens mit Mikroalgen-Bakterien-Flocken	43
Abb. 12: Messung der Sauerstoffkonzentration im Überstand und in den Algen-Bakterien-Flocken im dunklen und belichtet	44
Abb. 13: Übersicht des CSB-Gehaltes im Zulauf beider Pilotanlagen.....	46
Abb. 14: Übersicht des Biopolymergehaltes der extrazellulären polymeren Substanzen aus der ALBA Abwasserreinigung beider Pilotanlage in einem zeitlichen Verlauf von 15 Wochen	47
Abb. 15: Übersicht des Pigmentgehaltes der ALBA-Biomasse und im Nachklärbecken beider Reaktoren im Versuchszeitraum von 15 Wochen.	48
Abb. 16: DGGE-Profil des 800 L-Reaktors. Amplifizierte 16S-rRNA-Genfragmente der isolierten DNA Probe.....	50
Abb. 17: DGGE-Profil des 1600 L-Reaktors. Amplifizierte 16S-rRNA-Genfragmente der isolierten DNA Probe.....	52
Abb. 18: DGGE-Profil des 800 L-Reaktors. Amplifizierte 18S-rRNA-Genfragmente der isolierten DNA	55

Abb. 19: Untersuchung der Populationsdynamik mittels DGGE im 1600 L-Reaktor.....	57
Abb. 20: Relative Häufigkeiten phylogenetischer Gruppen in der Pilotanlage (800 L) zu den Zeitpunkten 2., 8. und 15. Woche.....	60
Abb. 21: Relative Häufigkeiten innerhalb der Proteobacteria Klassen Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta- und Epsilonproteobacteria.	61
Abb. 22: Relative Häufigkeiten innerhalb der Ordnungsebene der Klassen Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta- und Epsilonproteobacteria.....	62
Abb. 23: Zusammenfassung aller Photosynthese-Lichtkurven unterschiedlicher Zelldichten und den dazugehörigen Chlorophyllgehalten von <i>C. vulgaris</i>	64
Abb. 24: Zusammenfassung aller erhobenen PI-Kurven unterschiedlicher Zelldichten von <i>Chlorella vulgaris</i>	65
Abb. 25: Zusammenfassung aller erhobenen RLC unterschiedlicher Zelldichten von <i>C. vulgaris</i>	67
Abb. 26: Sedimentation der ALBA-Flocken im 2 L Laborreaktor	68
Abb. 27: Darstellung des Desintegrationserfolg von ALBA-Flocken unterschiedlicher Konzentrationen von Formaldehyd.....	70
Abb. 28: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der ALBA-Flocken nach der Behandlung mit 1% Formaldehydlösung für 240 min.....	71
Abb. 29: Darstellung der Desintegrationserfolge bei mechanischer und physikalischer Behandlung von ALBA-Flocken.....	72
Abb. 30: Mikroskopische Aufnahmen der ALBA-Flocken vor der Behandlung von 2 mm Glasperlen.....	74
Abb. 31 Darstellung des Desintegrationserfolgs von vier verschiedenen Methoden und den Einfluss auf die photosynthetische Aktivität	75
Abb. 32: Darstellung der Extinktionsspektren von Algen- und Bakterienreinkulturen	76
Abb. 33: Vergleich der Übereinstimmung zwischen berechnetem- und eingestelltem TS-Verhältnis von Algen zu Bakterien der Koeffizientenmatrix 1 und 2	77
Abb. 34: Überblick der Verläufe aufgenommener Parameter (Trockensubstanzmenge, F_v/F_m , CSB- und Chlorophyllgehalt) unterschiedlich angesetzter Verhältnisse von Algen- zu Bakterienkonzentrationen.....	79
Abb. 35: Verläufe aufgenommener Nährstoffe (Ammonium, Nitrit, Nitrat und Phosphat). Von unterschiedlich angesetzter Verhältnisse von Algen- zu Bakterienkonzentrationen.....	80
Abb. 36: Überblick der Verläufe aufgenommener PI-Parameter (P_{max} , Respiration, I_k (Lichtsättigungspunkt) und I_c (Lichtkompensationspunkt) unterschiedlich angesetzter Verhältnisse von Algen- zu Bakterienkonzentrationen.....	81
Abb. 37: Berechnete Verhältnisse von Algen und Bakterienkonzentration beider Versuchsansätze 2:1 und 1,5:1	83

Abb. 38: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der vielschichtige und verflochtene Struktur der ALBA-Flocken.....	85
Abb. 39: Rasterelektronenmikroskopischer Überblick von kompakten Algen-Bakterien-Flocken während der Abwasserreinigung.....	86
Abb. 40: Rasterelektronische Nahaufnahme von Algen-Bakterien Flocken aus der Abwasserreinigung.....	86
Abb. 41: Rasterelektronische Nahaufnahme von Algen-Bakterien-Flocken aus der Abwasserreinigung.....	87
Abb. 42: Durchführungsschema für die Erstellung der Koeffizientenmatrix für MATLAB® und die Quantifizierung von Algen und Bakterienanteilen aus einer Mischprobe.....	128

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Nährstoffzusammensetzung des KC-Mediums.	13
Tab. 2: Nährstoffzusammensetzung des synthetischen Abwassers.....	14
Tab. 3: Oligonukleotide zur Herstellung von 16S-rRNA und 18S-rRNA Amplikons.	20
Tab. 4: Reaktionsbedingung zur Amplifikation.....	21
Tab. 5: Übersicht über die verwendeten Denaturierungslösungen.....	22
Tab. 6: Pipettierschema zur Herstellung des Acrylamidgels für die bakterielle Trennung.	23
Tab. 7: Übersicht über die verwendeten Küvettentests für die Wasseranalysen.	31
Tab. 8: Übersicht der verwendeten Lösungen zur Bestimmung des Proteingehalts.....	33
Tab. 9: Übersicht der Lösungen für den Nachweis von Kohlenhydraten.	33
Tab. 10: Reihenfolge der Schritte zur Fixierung und Dehydrierung von Zellen.	36
Tab. 11: Phylogenetische Zuordnung der sequenzierten DGGE-Banden der amplifizierten 16S-rRNA-Genfragmente aus dem 800 L-Reaktor.	51
Tab. 12: Phylogenetische Zuordnung der sequenzierten DGGE-Banden der amplifizierten 16S-rRNA- Genfragmente aus dem 1600 L-Reaktor	53
Tab. 13: Analyse der nächsten Verwandten Arten im 800 L-Reaktor.....	56
Tab. 14: Analyse der nächsten Verwandten Arten im 1600 L-Reaktor.....	58
Tab. 15: Zusammenfassung der Miseq Reads	59
Tab. 16: Zusammenfassende Übersicht über die Mengenverteilung der gemessenen EPS-Komponenten im 2 L-Reaktor, 800 L- und 1600 L-Pilotanlage.....	91
Tab. 17: Übersicht der Werte für die Koeffizientenmatrizen	125

Anhang

Tab. 17: Übersicht der Werte für die Koeffizientenmatrizen die für die Rein- und Misch-Modelle verwendet wurden.

Wellenlänge	Extinktionskoeffizienten			
	Rein-Modelle (Koeffizientenmatrix 1)		Misch-Modelle (Koeffizientenmatrix 2)	
	Algen $L g^{-1} cm^{-1}$	Bakterien $L g^{-1} cm^{-1}$	Algen $L g^{-1} cm^{-1}$	Bakterien $L g^{-1} cm^{-1}$
320	5,80	5,61	5,50	6,44
325	5,77	5,60	5,47	6,40
330	5,70	5,51	5,40	6,30
335	5,62	5,40	5,33	6,16
340	5,55	5,30	5,25	6,03
345	5,46	5,18	5,18	5,88
350	5,39	5,06	5,10	5,72
355	5,32	4,96	5,04	5,59
360	5,27	4,84	4,98	5,44
365	5,23	4,73	4,94	5,31
370	5,19	4,61	4,91	5,17
375	5,17	4,45	4,88	5,00
380	5,15	4,35	4,86	4,89
385	5,13	4,25	4,84	4,78
390	5,10	4,15	4,80	4,68
395	5,06	4,06	4,76	4,58
400	5,02	3,98	4,73	4,50
405	5,01	3,92	4,72	4,43
410	5,05	3,84	4,75	4,35
415	5,10	3,76	4,80	4,27
420	5,14	3,68	4,83	4,18
425	5,16	3,60	4,86	4,09
430	5,21	3,52	4,91	4,01
435	5,32	3,43	4,99	3,92
440	5,40	3,36	5,07	3,84
445	5,44	3,30	5,12	3,77
450	5,42	3,24	5,08	3,71
455	5,36	3,18	5,03	3,65
460	5,31	3,13	4,99	3,59
465	5,28	3,08	4,96	3,54
470	5,28	3,03	4,96	3,48

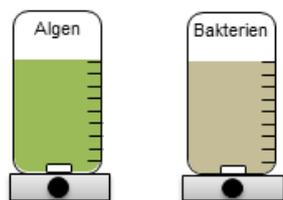
475	5,29	2,99	4,97	3,43
480	5,30	2,93	4,98	3,36
485	5,32	2,89	5,00	3,32
490	5,35	2,84	5,02	3,26
495	5,36	2,80	5,04	3,22
500	5,34	2,75	5,03	3,17
505	5,30	2,71	4,98	3,12
510	5,23	2,67	4,92	3,08
515	5,14	2,63	4,84	3,04
520	5,04	2,59	4,76	2,99
525	4,96	2,56	4,68	2,95
530	4,88	2,52	4,60	2,92
535	4,81	2,49	4,54	2,88
540	4,74	2,45	4,47	2,84
545	4,69	2,42	4,42	2,81
550	4,63	2,39	4,37	2,77
555	4,57	2,36	4,31	2,74
560	4,52	2,33	4,26	2,71
565	4,47	2,30	4,21	2,68
570	4,43	2,28	4,18	2,65
575	4,40	2,25	4,15	2,62
580	4,38	2,22	4,13	2,59
585	4,35	2,20	4,10	2,57
590	4,32	2,18	4,08	2,54
595	4,30	2,15	4,05	2,51
600	4,27	2,13	4,02	2,49
605	4,24	2,11	3,99	2,46
610	4,22	2,09	3,97	2,44
615	4,20	2,07	3,95	2,42
620	4,19	2,05	3,95	2,40
625	4,17	2,03	3,93	2,37
630	4,14	2,01	3,90	2,35
635	4,08	1,98	3,85	2,32
640	4,03	1,97	3,79	2,30
645	4,02	1,95	3,78	2,28
650	4,08	1,93	3,84	2,27
655	4,11	1,91	3,86	2,24
660	4,12	1,89	3,88	2,22
665	4,27	1,88	4,00	2,21
670	4,50	1,86	4,24	2,19
675	4,75	1,84	4,46	2,18
680	4,96	1,83	4,66	2,16

685	5,17	1,81	4,87	2,14
690	5,18	1,79	4,89	2,12
695	5,03	1,78	4,75	2,10
700	4,82	1,76	4,56	2,07
705	4,63	1,74	4,39	2,04
710	4,51	1,72	4,26	2,03
715	4,40	1,71	4,15	2,01
720	4,30	1,69	4,07	1,99
725	4,22	1,68	3,99	1,98
730	4,16	1,66	3,93	1,96
735	4,09	1,65	3,87	1,94
740	4,04	1,64	3,82	1,92
745	3,99	1,62	3,76	1,90
750	3,94	1,61	3,73	1,89
755	3,90	1,60	3,68	1,88
760	3,86	1,58	3,64	1,86
765	3,82	1,57	3,60	1,84
770	3,78	1,55	3,57	1,83
775	3,75	1,54	3,53	1,81
780	3,71	1,53	3,50	1,79
785	3,68	1,52	3,48	1,77
790	3,65	1,51	3,44	1,77
795	3,61	1,49	3,41	1,75
800	3,58	1,48	3,38	1,73

Durchführung für die Erstellung der Koeffizientenmatrix in MATLAB®

1. Kultivierung

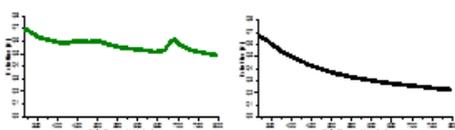
Reinkultur Mikroalgen & Belebtschlamm als Bakterieninokula



2. Erstellung der Koeffizientenmatrix

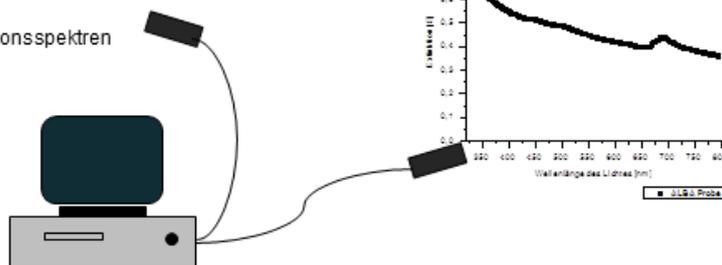
-zwei Extinktionsmodelle möglich-

Modell 1: Aufnahme von Extinktionsspektren (320-800 nm) von Algen- und Bakterienreinkulturen und die Messung der TS
 Modell 2: Aufnahme von Absorptionsspektren von Algen-Bakterien Mischproben, deren Zusammensetzung bekannt ist.



3. MATLAB®

Einspeisung der Extinktionsspektren



4. Berechnungsprozess MATLAB®

Werte des Wellenlängenscan hochladen
 Berechnungsprozess der Algen- und Bakterienanteile in der Probe

Quantifizierung der Algen und Bakterienkonzentration aus Mischproben

1. Desintegration der ALBA-Probe

Glas Beads oder Ultraschall



2. Vorbereitung für die photometrische Messung

Küvette mit desintegrierter Probe
 $100\mu\text{l}$ Probe + $1900\mu\text{L}$ $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$



3. Wellenlängenscan der Probe (320nm- 800nm in 5nm Schritten)

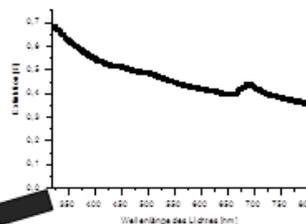


Abb. 42: Durchführungsschema für die Erstellung der Koeffizientenmatrix für MATLAB® und die Quantifizierung von Algen und Bakterienanteilen aus einer Mischprobe.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den

Unterschrift:

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen herzlichen Dank an alle aussprechen, die mich während meiner Promotion begleitet und unterstützt haben.

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. D. Hanelt bedanken für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen und dass er mich mit seinen Ideen und Kritik unterstützt hat.

Ganz besonders danke ich Herrn PD Dr. A. Pommerening-Röser für die Zweitkorrektur dieser Arbeit. Ebenfalls danke ich ihm für seine engagierte Betreuung, sowie die interessanten und aufschlussreichen Gespräche.

Prof. Dr.-Ing. Kerstin Kuchta danke ich für ihren fundierten Rat, ihre Unterstützung und für das Vertrauen, dass Sie mir in der ganzen Zeit entgegen gebracht hat.

Die vorliegende Arbeit wurde durch die Papiertechnische Stiftung und das Institut für Umwelttechnik und Energiewirtschaft (TUHH) innerhalb des ALBAPRO-Projekts, das im Rahmen des IGF CORNET 863 EN gefördert wurde, finanziert. Für die bereitgestellten Mittel möchte ich mich an dieser Stelle bedanken.

Weiterer Dank gebührt meinem Bürokollegen Dr. Dominik Patzelt, unsere gegenseitigen Aufmunterungen während dieser Jahre haben mich durchhalten lassen.

Danke an Sarah Lohn und Timo Steinbrecher, es war eine schöne Zeit euch während eures Studiums zu begleiten. Timo ich freue mich immer noch sehr, dass du durch Zufall, auf mich als Betreuerin für deine Bachelorarbeit gestoßen bist und du dich auf das Thema eingelassen hast. Aufgrund dieser Zusammenarbeit sind so tolle Ergebnisse entstanden.

Dominik, Nils, Rahmania, Stefan, Mark, Abdo, Hadi, Florian, vielen Dank für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Während meiner Schwangerschaft konnte ich mich auf eine Vielzahl von Menschen verlassen. Jacqueline Huber (Vermicon) danke ich, dass sie die DGGE-Gele gegossen und die fotografischen Aufnahmen gemacht hat. Sarah Lohn danke ich, dass sie die Untersuchungen für die EPS Komponenten durchgeführt hat. Elke, danke für die Anfertigung der hervorragenden TEM-Bilder für meine Arbeit.

Ich danke allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Abteilung der Aquatische Ökophysiologie und Phykologie für ihre Hilfe, das gute Arbeitsklima und ihre Unterstützung bei aufgetretenen Fragen.

Ein herzliches Dankeschön gilt meinen Eltern, Olga & Friedrich, die mich in jeder Hinsicht immer unterstützt haben und ohne die ich es nicht geschafft hätte.

Der größte Dank gilt meinem geliebten Ehemann Thomas, der mir im Laufe dieser Jahre immer zur Seite stand und mich stetig motiviert hat nicht aufzugeben.

Diese Arbeit widme ich meinem Sohn Theo. Ich danke dir, dass du da bist!