

**Produktion biogener Calcit-Partikel mittels  
Coccolithophoriden  
- Entwicklung und Charakterisierung eines Kultivierungs-  
verfahrens für *Emiliana huxleyi***

Zur Erlangung des akademischen Grades einer  
DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)

von der KIT-Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik des  
Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)  
genehmigte

DISSERTATION

von  
M. Sc. Johanna Zander (geb. Bartsch)  
aus Duisburg

Tag der mündlichen Prüfung:	13.06.2024
Erstgutachter:	Prof. Dr.-Ing. Clemens Posten
Zweitgutachter:	Prof. Dr.-Ing. Matthias Franzreb



*„Contrariwise, if it was so, it might be; and if it were so,  
it would be; but as it isn't, it ain't. That's logic.“*

**Lewis Carroll**



# Kurzfassung

Die marine Mikroalge *Emiliana huxleyi* (*E. huxleyi*) kann durch Biomineralisierung komplexe Calcitpartikel (Coccolithen) erzeugen. 10-15 dieser Coccolithen ordnen sich um die Algenzelle herum an und bilden so eine Hülle (Coccosphäre). Trotz intensiver Forschung sind der genaue Mechanismus und die Ursache der Coccolithenbildung unbekannt. Für den Einsatz sind hingegen viele Möglichkeiten, wie beispielsweise als Komponente in Papier oder in Farb- und Lackpräparaten, denkbar. Aufgrund mangelnder Kultivierungsverfahren wurde der Einsatz dieser nicht fossilen Coccolithen jedoch bisher nicht realisiert. Um diese Problematik zu überwinden, ist das Ziel dieser Arbeit ein geeignetes Kultivierungsverfahren zu entwickeln, um ausreichend hohe Coccolithenausbeuten für erste Anwendungszwecke zu generieren.

Um das Wachstum und somit die Zellkonzentration zu steigern, wurde der *E. huxleyi* Stamm CCMP3266 im Schüttelkolben bei verschiedenen Hell-Dunkel-Zyklen mit einer Photonenflussdichte (PFD) von  $350 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  kultiviert. Dabei zeigte sich, dass der Einsatz eines 15:9-Zyklus (15 Stunden Licht, 9 Stunden Dunkelheit), die Zellkonzentration im Vergleich zu einer permanenten Beleuchtung, um 70 % steigern konnte. Die erreichte Coccolithen-Konzentration im Hell-Dunkel-Zyklus reduzierte sich jedoch um 46 %. Diese Beobachtung wurde in einer anschließenden Kultivierung im Photobioreaktor bestätigt. Die Ergebnisse zeigen, dass sich der Zellzyklus an das vorliegende Lichtregime anpasst. Bei einem Hell-Dunkel-Zyklus findet die Zellteilung in der Dunkelphase statt, bei permanentem Licht hingegen sobald die intrazellulären Energiespeicher gefüllt sind. Die Kulturen im Hell-Dunkel-Zyklus besitzen dadurch eine verbesserte Lichtnutzungseffizienz, da die Zellen bei einer permanenten Beleuchtung für die Dauer der Zellteilung keine Photosynthese betreiben und somit die Lichtenergie nicht nutzen können. Die Produktion der Coccolithen ist jedoch ein energieintensiver und somit lichtabhängiger Prozess, wodurch die permanente Kultur von der durchgängigen Lichtverfügbarkeit profitiert und dadurch höhere Coccolithenausbeuten erreicht.

Da das verwendete *Enriched Seawater, Artificial Water* (ESAW)-Medium natürliches Meerwasser simuliert, sind die enthaltenen Elemente für die Biomasseproduktion zu niedrig konzentriert. In einem ersten Schritt wurde anhand der makromolekularen Zusammensetzung von Mikroalgen auf die elementare Zusammensetzung geschlossen. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen sollte die Zell- und Coccolithen-Konzentration durch die Modifikation des ESAW-Mediums gesteigert werden. So konnte durch die sukzessive Variation aller enthaltenen Elemente die Zellzahl im Schüttelkolben um 258 % und die Coccolithen-Konzentration um 516 % gesteigert werden. Dabei zeigte sich, dass die elementare Zusammensetzung der Coccolithen stark von den Konzentrationen im Medium beeinflusst wird. So kann anhand der Ergebnisse die Hypothese aufgestellt werden, dass Magnesium und Silizium das im Calcit enthaltene Calcium ersetzen können.

Mit dem modifizierten ESAW-Medium wurden anschließend Kultivierungen in vier Photobioreaktoren (Rührkessel-, Schlauch-, Bag- und Membran-Reaktor) mit einem Volumen zwischen 1,6 und 14 L durchgeführt. Alle Versuche wurden im Batch-Betrieb bei  $T = 19 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{vvm} = 0,05$ ,  $\text{pH} 8$ ,  $\text{pCO}_2 = 1\%$  und  $\text{PFD} = 350 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  durchgeführt. Die Reaktoren unterschieden sich in ihrer

Begasungsart (Oberflächen-, Membran- oder Blasenbegasung), ihrer Durchmischung (durch Wellen, Begasung oder Rührelemente) und ihrer Geometrie.

Im Rührkesselreaktor konnte kein Wachstum der Alge beobachtet werden, da die mechanische Belastung aufgrund der verbauten Rührer und Stromstörer für die empfindlichen Zellen zu hoch war. Im Schlauchreaktor konnten äußerst hohe Zellkonzentrationen erreicht werden. Somit scheint die verwendete Blasenbegasung einen enorm positiven Effekt auf das Wachstum von *E. huxleyi* zu besitzen. Der Blasendurchmesser war sehr gering, was zu einer größeren Gasaustauschfläche führte als beispielsweise eine Kopfraumbegasung, wie im Bag- oder Rührkesselreaktor. Es konnte jedoch keine Coccolithenproduktion nachgewiesen werden. Dies könnte zum einen an der Zerstörung der Coccosphäre durch die Blasenbegasung liegen. Zum anderen kann die Zelle aufgrund der guten CO<sub>2</sub>-Versorgung den Metabolismus vollständig zu Gunsten des Wachstums organisiert haben, wodurch die Kalzifizierung reduziert wurde. Die Kultivierungen im Bag- und Membranreaktor lieferten die vielversprechendsten Ergebnisse. So wurde im Bag-Reaktor (14 L) nach 4 Wochen eine Coccolithenausbeute von insgesamt 53 g erreicht, während es im Membranreaktor (2 L) nach 3 Wochen 4 g waren. Somit scheint eine schonende Durchmischung und Begasung essentiell für den Erfolg der Kultivierung von *E. huxleyi* zu sein.

Aufgrund der positiven Ergebnisse im Membran- und Bag-Reaktor wurde in beiden Reaktoren eine semi-kontinuierliche Kultivierung durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass beide Reaktoren trotz regelmäßiger Volumenentnahme für einen längeren Zeitraum (etwa 4 Wochen) stabil liefen. Der Membranreaktor erreichte dabei eine Coccolithenausbeute von insgesamt 8 g. Die Ausbeute hat sich somit im Vergleich zum Batch-Versuch verdoppelt. Im Bag-Reaktor konnte die Ausbeuten auf 82 g gesteigert werden. Dabei handelt es sich um die bisher höchste gemessene Coccolithenausbeute. Dieses Ergebnis zeigt, dass eine Massenproduktion der Coccolithen durchaus realisierbar ist und das hier etablierte Kultivierungsverfahren als Grundlage für weitere Modifikationen dienen kann.

# Abstract

The marine microalgae *Emiliana huxleyi* (*E. huxleyi*) can produce complex calcite particles (coccoliths) through biomineralization. 10-15 of these coccoliths arrange themselves around the algae cell, forming a shell (coccosphere). Despite intensive research, the exact mechanism and cause of coccolith formation are unknown. However, there are many possible uses, such as being a component in paper or in paint and varnish. Due to a lack of cultivation methods, the use of these non-fossil coccoliths has not yet been realized. To overcome this problem, this work strives to develop a suitable cultivation method to generate sufficiently high coccolith yields for initial applications.

In order to increase growth and thus the cell concentration, the *E. huxleyi* strain CCMP3266 was cultivated in a shake flask under various light-dark cycles with a photon flux density (PFD) of  $350 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . It was shown that the use of a 15:9 light-dark cycle (15 hours of light, 9 hours of darkness) can increase the cell concentration by 70% compared to permanent light. However, the coccolith concentration achieved in the light-dark cycle was reduced by 46%. This observation was confirmed by a following cultivation in a photobioreactor. The results show that the cell cycle adapts to the existing light conditions. In a light-dark cycle, cell division occurs in the dark phase, whereas in permanent light, cell division occurs as soon as the intracellular energy storages are filled. The cultures in the light-dark cycle therefore have an improved light usage efficiency, since the cells do not carry out photosynthesis under permanent lighting for the duration of cell division. Because of that, they cannot use the light energy. However, the production of coccoliths is an energy-intensive and therefore light-dependent process, meaning that the permanent culture benefits from the continuous availability of light and thus achieves higher coccolith yields.

Since the used *Enriched Seawater, Artificial Water* (ESAW) medium simulates natural seawater, the contained elements are too low in concentration for biomass production. In a first step, the elemental composition was determined based on the macromolecular composition of microalgae. Building on these findings, the cell and coccolith concentration should be increased by modifying the ESAW medium. By successively varying all the containing elements, the number of cells in the shake flask could be increased by 258% and the coccolith concentration by 516%. It was shown that the elemental composition of the coccoliths is strongly influenced by the concentrations in the medium. Based on the results, it can be assumed that both magnesium and silicon can replace the calcium contained in calcite.

Cultivations with the modified ESAW medium were carried out in four photobioreactors (stirred tank, tube, bag and membrane reactors) with a volume between 1.6 and 14 L. The parameters for each cultivation were  $T = 19 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{vvm} = 0.05$ ,  $\text{pH} = 8$ ,  $\text{pCO}_2 = 1\%$  and  $\text{PFD} = 350 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  in batch operation. Differences of the reactors are their type of aeration (surface, membrane or bubble), their mixing (through waves, gassing or stirring elements) and their geometry.

No algae growth could be observed in the stirred tank reactor because the mechanical stress was too high for the sensitive cells due to the stirrers and baffles. Extremely high cell concentrations could be achieved in the tube reactor. The used bubble fumigation appears to have an enormously positive effect on the growth of *E. huxleyi*. The bubble diameter was very small, which led to a

larger gas exchange area than, for example, headspace gassing, like it was used in the bag or stirred tank reactor. However, no coccolith production could be detected. On the one hand, this could be due to the destruction of the coccosphere by bubble fumigation. On the other hand, due to the good supply of CO<sub>2</sub>, the cell may have completely organized its metabolism in favor of growth, thereby reducing calcification. The cultivations in the bag and membrane reactor delivered the most promising results. In the bag reactor (14 L) a total coccolith yield of 53 g was achieved after 4 weeks, while in the membrane reactor (2 L) it was 4 g after 3 weeks. Gentle mixing and fumigation therefore appear to be essential for the success of the cultivation of *E. huxleyi*.

Due to the positive results in the membrane and bag reactors, semi-continuous cultivation was carried out in both reactors. These experiments revealed that both reactors ran stable for a longer period of time (around 4 weeks) despite of regular volume withdrawal. The membrane reactor achieved a total coccolith yield of 8 g. The yield therefore has doubled compared to the batch cultivation. In the bag reactor the yields could be increased to 82 g, which is the highest coccolith yield measured to date. These results show that mass production of coccoliths is certainly feasible and that the cultivation process established here can serve as a basis for further modifications.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Kurzfassung</b> .....	<b>i</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>iii</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>v</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>vii</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>xi</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>xiii</b>
<b>Symbolverzeichnis</b> .....	<b>xiv</b>
<b>Vorwort</b> .....	<b>xv</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Ausgangssituation.....	1
1.2 Zielsetzung der Arbeit .....	2
<b>2 Theoretische Grundlagen</b> .....	<b>5</b>
2.1 Die Kalkalge <i>Emiliana huxleyi</i> .....	5
2.2 Die Kalzifizierung .....	7
2.3 Der Zellzyklus .....	9
2.4 Bisherige Kultivierungsverfahren.....	12
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>15</b>
3.1 Algenstämme .....	15
3.2 Stammhaltung und Vorkulturen.....	15
3.2.1 Medium .....	15
3.2.2 Stammhaltung.....	15
3.3 Schüttelkolbenversuche .....	16
3.3.1 Hell-Dunkel-Zyklen .....	16
3.3.2 Variation der Photonenflussdichte .....	17
3.3.3 Optimierung des Mediums .....	17
3.4 Kultivierungen in Photobioreaktoren.....	18
3.4.1 Rührkesselreaktor .....	19
3.4.2 Bag-Reaktor.....	20
3.4.3 Membranreaktor .....	21
3.4.4 Schlauchreaktor .....	23
3.5 Analytik .....	24
3.5.1 Mikroskopie.....	24
3.5.2 Bestimmung der Zellzahl .....	25
3.5.3 Bestimmung der Coccolithen-Konzentration .....	25
3.5.4 Bestimmung der Coccolithenmasse .....	25

3.5.5	Bestimmung der Nährstoffverbrauches .....	26
3.5.6	Bestimmung der Makromischzeit .....	27
3.6	Berechnungen .....	28
3.6.1	Berechnungen des Wachstums und der Kalzifizierung .....	28
3.6.2	Berechnungen zur Charakterisierung der Reaktoren .....	29
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>31</b>
4.1	Der Einfluss von Hell-Dunkel-Zyklen auf das Wachstum und die Kalzifizierung von <i>Emiliana huxleyi</i> .....	31
4.1.1	Schüttelkolbenversuche .....	32
4.1.2	Übertragung der Hell-Dunkel-Zyklen auf einen Rührkesselreaktor .....	37
4.1.3	Fazit der Kultivierung von <i>Emiliana huxleyi</i> unter Hell-Dunkel- Zyklen .....	49
4.2	Optimierung der Nährstoffverfügbarkeit des Mediums zur Coccolithenproduktion .....	50
4.2.1	Makromolekulare und elementare Zusammensetzung von Mikroalgen .....	50
4.2.2	Optimierung des ESAW-Mediums für die Kultivierung von <i>Emiliana huxleyi</i> zur Coccolithproduktion .....	58
4.3	Kultivierung von <i>Emiliana huxleyi</i> in vier Reaktorsystemen .....	72
4.3.1	Der Rührkesselreaktor .....	74
4.3.2	Der Bag-Reaktor .....	77
4.3.3	Der Schlauchreaktor .....	80
4.3.4	Der Membranreaktor .....	82
4.3.5	Kultivierung von <i>Emiliana huxleyi</i> im semi-kontinuierlichen Betrieb .....	85
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>91</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>95</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>97</b>
7.1	Studentische Abschlussarbeiten .....	97
7.2	Material und Methoden .....	98
7.2.1	Verwendete Geräte und Kits .....	98
7.2.2	ESAW-Medium .....	100
7.3	Ergebnisse .....	106
7.3.1	Einsatz von Hell-Dunkel-Zyklen .....	106
7.3.2	Einfluss niedriger Photonenflussdichten auf das Wachstum und die Kalzifizierung von <i>Emiliana huxleyi</i> .....	117
7.3.3	Optimierung des ESAW-Mediums .....	121
7.3.4	Reaktorkultivierungen .....	128

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1 Links: <i>Emiliana huxleyi</i> -Zelle mit Coccolithen, Rechts: Einzelne Coccolithen (Fotos von: Dr. Birgit Hetzer, Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik, Max Rubner-Institut, Karlsruhe).....	5
Abbildung 2.3: Untereinheiten einer Coccolithe (aus [261]) .....	9
Abbildung 2.4: Binäre Spaltung (nach [87, 126, 263]) .....	11
Abbildung 3.1: Fließbild der Anlage mit dem Rührkesselreaktor.....	19
Abbildung 3.2: Fließbild der Anlage mit dem Bag-Reaktor .....	21
Abbildung 3.3: Fließbild der Anlage mit dem Membranreaktor. (Quelle: Anastassia Trikin, modifiziert).....	22
Abbildung 3.4: Fließbild der Anlage mit dem Schlauchreaktor (Quelle: Anastassia Trikin, modifiziert).....	24
Abbildung 4.1: A: Der niedrig-kalzifizierende Stamm CCMP371, B: Der hoch-kalzifizierende Stamm CCMP3266 (Quelle: [76]).....	32
Abbildung 4.2: Übersicht der Anpassung des Zellzyklus an Hell-Dunkel-Zyklen. Dauer der S- und G <sub>2</sub> +M-Phase aus [148].....	34
Abbildung 4.3: Zusammenfassung der Ergebnisse der Hell-Dunkel-Zyklen aus dem Rührkesselreaktor. Links: Verläufe der Zellzahl (oben) sowie der Coccolithen-Konzentration (unten) während der Kultivierung mit einem 15:9-Zyklus und einer permanenten Beleuchtung mit 350 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Rechts: Darstellung der Wachstumsrate $\mu$ (oben) und Coccolithen-Produktivität (unten). Die grauen Bereiche kennzeichnen die Dunkelphase während der Versuche .....	38
Abbildung 4.4: Verlauf des $p_{\text{O}_2}$ während der Kultivierung mit einem 15:9-Hell-Dunkel-Zyklus. Die schwarzen Punkte markieren den Start der Dunkel-Phase ab einer Prozesszeit von 200 h .....	41
Abbildung 4.5: Verlauf des $p_{\text{O}_2}$ kurz vor Beginn der Dunkelphase .....	42
Abbildung 4.6: Verlauf des $p_{\text{O}_2}$ während der Kultivierung mit einer permanenten Beleuchtung.....	43
Abbildung 4.7: Verlauf der Konzentrationen sowie der Aufnahmeraten von Phosphat, Nitrat und Calcium während der Kultivierungen im Rührkesselreaktor mit einem 15:9-Hell-Dunkel-Zyklus und mit einer permanenter Beleuchtung mit einer PFD von 350 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .....	46
Abbildung 4.8: Geschätzte makromolekulare und elementare Zusammensetzung einer Algenzelle.....	57
Abbildung 4.9: Links: Verlauf der Zellzahl (oben) und Coccolithen-Konzentration (unten) während der Kultivierung mit Natriumnitrat ( $\text{NaNO}_3$ ) und Ammoniumchlorid ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) als Stickstoffquelle. Rechts: Der Einfluss	

	der Stickstoffquelle auf die Wachstumsrate (oben) und zelluläre Coccolithen-Produktivität (unten) von <i>E. huxleyi</i> .....	59
Abbildung 4.10:	Darstellung der höchsten Zell- und Coccolithen-Konzentrationen der sechs Modifikationsansätze des ESAW-Mediums zur Wachstums- und Kalzifizierungsoptimierung .....	63
Abbildung 4.11:	Überblick der Ergebnisse aus den Reaktorversuchen. Abkürzungen stehen für R: Rührkesselreaktor, B: Bag-Reaktor, S: Schlauchreaktor, M: Membranreaktor.....	74
Abbildung 4.12:	Links: <i>E. huxleyi</i> -Zellen und Coccolithen in unbehandelten ESAW-Medium. Rechts: Coccolithen aus der zweiten Kultivierung im Bag-Reaktor (Fotos von: Dr. Birgit Hetzer, Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik, Max Rubner-Institut, Karlsruhe) .....	79
Abbildung 4.13:	Oben: Verlauf der approximierten Zellzahl (grün), der gemessenen Zellzahl (blau) und der Wachstumsrate (grau). Unten: Verlauf der approximierten Coccolithen-Konzentration (grün), der gemessenen Coccolithen-Konzentration (blau) und der zellulären Coccolithen-Produktivität (grau).....	86
Abbildung 4.14:	Oben: Verlauf der Zellzahl (grün) und der Wachstumsrate (blau). Unten: Verlauf der Coccolithen-Konzentration (grün) und der zellulären Coccolithen-Produktivität (blau). Die Erhöhung der PFD ist durch die verschiedenen Hintergrundfarben markiert .....	88
Abbildung 7.1:	Links: Verlauf der Zellzahl (oben) und Coccolithen-Konzentration (unten) während der Kultivierung unter vier verschiedenen Lichtbedingungen mit dem Stamm CCMP3266. Rechts: Verlauf der Wachstumsrate $\mu$ (oben) und zellulären Coccolithen-Produktivitäten (unten).....	106
Abbildung 7.2:	Links: Verlauf der Zellzahl (oben) und Coccolithen-Konzentration (unten) während der Kultivierung unter vier verschiedenen Lichtbedingungen mit dem Stamm CCMP371. Rechts: Verlauf der Wachstumsrate $\mu$ (oben) und zelluläre Coccolithen-Produktivität (unten).....	107
Abbildung 7.3:	Startkonzentration im ESAW-Medium (Balken links) und Endkonzentrationen an Phosphat, Nitrat und Calcium während der Kultivierung des Stammes CCMP3266 bei verschiedenen Lichtbedingungen .....	108
Abbildung 7.4:	Startkonzentration im ESAW-Medium (Balken links) und Endkonzentrationen an Phosphat, Nitrat und Calcium während der Kultivierung des Stammes CCMP371 bei verschiedenen Lichtbedingungen .....	109
Abbildung 7.5:	Anteil an nicht-kalzifizierten Zellen während der Kultivierung bei unterschiedlichen Lichtregimen des Stammes CCMP3266 (links) und CCMP371 (rechts). Die Sterne markieren den Kultivierungstag, der die höchste Zell-Konzentration erreicht hat .....	110

Abbildung 7.6: Zellen des Stammes CCMP3266 ohne Coccolithen.....	110
Abbildung 7.7: Links: Verlauf der Zellzahl während der Kultivierung unter vier verschiedenen Lichtbedingungen mit dem Stamm RCC1217. Rechts: Verlauf der Wachstumsrate $\mu$ .....	111
Abbildung 7.8: Startkonzentration im ESAW-Medium (Balken links) und Endkonzentrationen an Phosphat, Nitrat und Calcium während der Kultivierung des Stammes RCC1217 bei verschiedenen Lichtbedingungen .....	113
Abbildung 7.9: Aggregierte Zellen im Schüttelkolben.....	117
Abbildung 7.10: Links: Verlauf der Zellzahl (oben) und Coccolithen-Konzentration (unten) während der Kultivierung .....	120
Abbildung 7.11: Endkonzentrationen an Phosphat und Nitrat der Versuchsreihen mit unterschiedlichen Photonenflussdichten .....	121
Abbildung 7.12: 1. Modifikationsansatz: Erhöhung der Konzentrationen an Phosphat, Nitrat, den Spurenelementen und den Vitaminen um das 25x, 50x und 100x. Im Vergleich dazu sind die Kurvenverläufe des ESAW-Mediums dargestellt .....	124
Abbildung 7.13: 2. Modifikationsansatz: Erhöhung der Konzentrationen an Phosphat, Nitrat und den Vitaminen um das 25x, 50x und 100x. Die Konzentration der Spurenelemente betrug das 0,25-fache .....	124
Abbildung 7.14: 3. Modifikationsansatz: Erhöhung der Konzentrationen an Phosphat, Nitrat und den Spurenelementen um das 25x, 50x und 100x. Die Konzentration der Vitamine lag bei der 1x und 50x.....	125
Abbildung 7.15: 4. Modifikationsansatz: Erhöhung der Konzentrationen an Phosphat, Nitrat und den Spurenelementen um das 25x, Erhöhung der Vitaminkonzentration um das 50x und Variation der Eisenkonzentration um das 5- und 25-fache .....	125
Abbildung 7.16: 5. Modifikationsansatz: Erhöhung der Konzentrationen an Phosphat, Nitrat und den Spurenelementen um das 25x, Erhöhung der Vitaminkonzentration um das 50x und Variation der Siliziumkonzentration um das 2,5- und 12,5-fache.....	126
Abbildung 7.17: 6. Modifikationsansatz: Verdopplung und Vervierfachung der Salzlösung I und II. Zudem Erhöhung der Konzentrationen an Phosphat, Nitrat und den Spurenelementen um das 25x, Erhöhung der Vitaminkonzentration um das 50x und Erhöhung der Siliziumkonzentration um das 12,5-fache .....	126
Abbildung 7.18: Aggregierte Zellen bei einer 25-fachen Eisenkonzentration.....	127
Abbildung 7.19: Links: Verlauf der Zell- und Coccolithen-Konzentration. Rechts: Verlauf der Wachstumsrate und der Coccolithenbildungsrate während der ersten Kultivierung in vier verschiedenen Reaktorsystemen .....	128
Abbildung 7.20: Erste Kultivierungsversuche. Links: Konzentrationsverläufe von Phosphat, Nitrat und Calcium. Rechts: Verlauf der	

	Nährstoffverbrauchsdaten. Sternsymbole kennzeichnen die Tage, an denen die Nährstoffe nachgefüllt wurden.....	129
Abbildung 7.21:	Links: Verlauf der Zell- und Coccolithen-Konzentration. Rechts: Verlauf der Wachstumsrate und der Coccolithenbildungsrate während der zweiten Kultivierung in vier verschiedenen Reaktorsystemen.....	130
Abbildung 7.22:	Zweite Kultivierungsversuche. Links: Konzentrationsverläufe von Phosphat, Nitrat und Calcium. Rechts: Verlauf der Nährstoffverbrauchsdaten. Sternsymbole kennzeichnen die Tage, an denen die Nährstoffe nachgefüllt wurden.....	131
Abbildung 7.23:	Zellablagerungen während der Kultivierung im Rührkesselreaktor .....	132
Abbildung 7.24:	Kontamination während der zweiten Reaktorkultivierung unter dem Mikroskop (10x Vergrößerung).....	132
Abbildung 7.25:	Ablagerungen im Schlauchreaktor .....	133
Abbildung 7.26:	Veränderung der Kulturbrühe während der Kultivierung im Schlauchreaktor .....	133
Abbildung 7.27:	Mikroskopische Aufnahme der Zellen ohne Coccusphäre aus dem Schlauchreaktor. Freie Coccolithen konnten beobachtet werden	133
Abbildung 7.28:	Mikroskopische Aufnahme der entnommenen nicht-kalzifizierte Zellen aus dem Schlauchreaktor nach 18 Tagen Inkubation im Schüttelkolben .....	134
Abbildung 7.29:	Schaumbildung und die dadurch resultierenden Zellablagerungen im Schlauchreaktor .....	134
Abbildung 7.30:	Bestimmung der Makromischzeit des Schlauchreaktors: Links: nach 3 Stunden. Rechts: Nach 16 Stunden. Die Sättigung der Farben wurde verstärkt .....	135
Abbildung 7.31:	Zellansammlungen zwischen Reaktorwand und Kühlschlange im Membranreaktor .....	135
Abbildung 7.32:	Kontamination im Membranreaktor .....	136
Abbildung 7.33:	Kontamination des Membranreaktors unter dem Mikroskop.....	136
Abbildung 7.34:	Verlauf der Temperatur, des pH-Wertes und des $p_{O_2}$ -Gehaltes während der ersten Kultivierung im Membranreaktor. ....	137
Abbildung 7.35:	Farbumschlag während der zweiten Kultivierung mit dem Membranreaktor .....	137
Abbildung 7.36:	Verlauf der Phosphatkonzentration (grün) und der Phosphataufnahmerate (blau) während der semi-kontinuierlichen Versuche im Bag- und Membranreaktor .....	138
Abbildung 7.37:	Verlauf der Coccolithenmasse während der semi-kontinuierlichen Versuche im Bag- und Membranreaktor .....	138

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Chemische Zusammensetzung von Coccolithen nach [92].....	8
Tabelle 2.2:	Zusammenfassung verschiedener Zellteilungsformen (nach [151]) ....	10
Tabelle 2.3:	Zusammenfassung der bereits durchgeführten Kultivierungen von <i>E. huxleyi</i> in Photobioreaktoren.....	13
Tabelle 3.1:	Übersicht der verwendeten Algenstämme.....	15
Tabelle 3.2:	Übersicht der Ansätze des Hell-Dunkel-Versuches im Schüttelkolben	17
Tabelle 3.3:	Überblick aller Modifikationen des ESAW-Mediums .....	18
Tabelle 3.4:	Zusammenfassung der Prozessparameter für die Kultivierungsversuche von <i>Emiliania huxleyi</i> .....	18
Tabelle 4.1:	Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen während der Kultivierung unter Hell-Dunkel-Zyklen und permanenter Beleuchtung .....	31
Tabelle 4.2:	Zusammenfassung der Hell-Dunkel-Versuche in den Schüttelkolben.	33
Tabelle 4.3:	Anteil an nicht-kalzifizierenden Zellen während der Hell-Dunkel-Versuche im Schüttelkolben.....	36
Tabelle 4.4:	Zusammenfassung der Ergebnisse der Rührkessel-Kultivierungen mit einem Hell-Dunkel-Zyklus und permanenter Beleuchtung.....	39
Tabelle 4.5:	Zusammenfassung des Verbrauches an Phosphat, Calcium und Phosphat während der Kultivierung im Rührkesselreaktor mit einem 15:9-Hell-Dunkel-Zyklus sowie einer permanenten Beleuchtung .....	47
Tabelle 4.6:	Makromolekulare Zusammensetzung in % der Biotrockenmasse für verschiedene Mikroalgen .....	51
Tabelle 4.7:	Aminosäureprofil von <i>Chlorella vulgaris</i> (Quelle: [199], modifiziert)	52
Tabelle 4.8:	Prozentualer Anteil einiger Elemente in <i>Chlorella vulgaris</i> <sup>a</sup> und in 36 marinen Mikroalgen <sup>b</sup> (Quelle: [199, 216], modifiziert) .....	56
Tabelle 4.9:	Veränderung des pH-Wertes während der Kultivierung mit NaNO <sub>3</sub> und NH <sub>4</sub> Cl .....	61
Tabelle 4.10:	Überblick der verschiedenen Versuchsansätze zur Optimierung des ESAW-Mediums .....	62
Tabelle 4.11:	Spurenelementzusammensetzung verschiedener Mikroalgen (mg pro kg Trockenmasse) [232].....	65
Tabelle 4.12:	Unterschiede zwischen der ersten und zweiten Reaktorkultivierung ...	73
Tabelle 4.13:	Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem Rührkesselreaktor .....	75
Tabelle 4.14:	Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem Bag-Reaktor .....	77
Tabelle 4.15:	Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem Schlauchreaktor .....	80
Tabelle 4.16:	Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem Membranreaktor .....	83

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 7.1:	Auflistung aller verwendeten Geräte und Assays.....	98
Tabelle 7.2:	Zusammensetzung des ESAW-Mediums nach [6, 17] .....	100
Tabelle 7.3:	Medium für die Kultivierungen in den Reaktoren.....	102
Tabelle 7.4:	Zusammensetzung des Mediums zum nachfüllen der Reaktoren.....	103
Tabelle 7.5:	Änderung aller Elementkonzentration während der Modifizierungsversuche des ESAW-Mediums. Alle Angaben sind in $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Die Bezeichnung der Ansätze entspricht denen, wie sie in Kapitel 3.3.3 in Tabelle 3.3 zusammengefasst sind.....	105
Tabelle 7.6:	Zusammenfassung des Nährstoffverbrauches der kalzifizierenden Stämme .....	109
Tabelle 7.7:	Zusammenfassung des Nährstoffverbrauches des nicht-kalzifizierenden Stammes.....	113
Tabelle 7.8:	Zusammenfassung der Ergebnisse während der Kultivierung mit unterschiedlichen PFDs .....	117
Tabelle 7.9:	Zusammenfassung des Nährstoffverbrauches bei Veränderung der PFD .....	121
Tabelle 7.10:	Berechnung des N-und S-Anteils an den Proteinen.....	122
Tabelle 7.11:	Berechnung des N-und Mg-Anteils an den Pigmenten .....	122
Tabelle 7.12:	Zusammensetzung der Nukleotide der RNS.....	122
Tabelle 7.13:	Berechnung des N-und P-Anteils an der RNS.....	123
Tabelle 7.14:	Zusammensetzung der Nukleotide der DNS .....	123
Tabelle 7.15:	Berechnung des N-und P-Anteils an der DNS.....	123
Tabelle 7.16:	Differenz der Start- und Endkonzentrationen an Phosphat, Nitrat und Calcium. Angaben in $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .....	127

# Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Definition
<b>ALP</b>	Alkalische Phosphatase
<b>C</b>	Kohlenstoff
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcium
<b>CaCO<sub>3</sub></b>	Calciumcarbonat
<b>Cl<sup>-</sup></b>	Chlor
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid
<b>CO<sub>3</sub><sup>2-</sup></b>	Carbonat-Ion
<b>CH<sub>4</sub></b>	Methan
<b>DNS</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b><i>E. huxleyi</i></b>	<i>Emiliana huxleyi</i>
<b>ESAW</b>	Enriched Seawater, Artificial Water
<b>ESTs</b>	Expressed Sequence Tags
<b>GPA</b>	Glutaminsäure-Prolin- und Alanin-reiche Ca <sup>2+</sup> -Protein
<b>H<sup>+</sup></b>	Wasserstoff
<b>HCl</b>	Chlorwasserstoff
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Hydrogencarbonat
<b>HD-Zyklen</b>	Hell-Dunkel-Zyklen
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Wasser
<b>KIT</b>	Karlsruher Institut für Technologie
<b>LED</b>	Light-emitting diode
<b>Na<sup>+</sup></b>	Natrium
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Natriumhydrogencarbonat
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O</b>	Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat
<b>NaNO<sub>3</sub></b>	Natriumnitrat
<b>NaOH</b>	Natriumhydroxid
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	Ammoniumchlorid
<b>N-Zelle</b>	Nackte Zelle
<b>OH<sup>-</sup></b>	Hydroxid-Ion
<b>PAR</b>	Photosynthetisch aktive Strahlung
<b>p<sub>CO2</sub></b>	Kohlendioxidpartialdruck
<b>PFD</b>	Photonenflussdichte
<b>p<sub>O2</sub></b>	Sauerstoffpartialdruck
<b>RNS</b>	Ribonukleinsäure
<b>ROS</b>	Reaktive Sauerstoffspezies
<b>RuBisCo</b>	Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase
<b>rpm</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>spp.</b>	Spezies
<b>vvm</b>	Volumen Gas pro Volumen begaste Flüssigkeit pro Minute
<b>ZIM</b>	Zentralen Innovationsprogramm Mittelstand

# Symbolverzeichnis

Symbol	Definition	Einheit
<b>A</b>	Oberfläche des Reaktors, die vom Licht bestrahlt wird	m <sup>2</sup>
<b>c<sub>Coccolithen</sub></b>	Coccolithen-Konzentration	Coccolithen·ml <sup>-1</sup>
<b>c<sub>x</sub></b>	Substratkonzentration	mg·L <sup>-1</sup>
<b>c<sub>Zellen</sub></b>	Zell-Konzentration	Zellen·ml <sup>-1</sup>
<b>d</b>	Rührerdurchmesser	m
<b>η</b>	dynamische Viskosität des Mediums	Pa·s
<b>I</b>	Lichtintensität	μmol·m <sup>-2</sup> ·s <sup>-1</sup>
<b>μ</b>	Wachstumsrate	d <sup>-1</sup>
<b>m<sub>Coccolithen</sub></b>	Coccolithenmasse	g·L <sup>-1</sup>
<b>N</b>	Zellzahl nach n Teilungen	Zellen·ml <sup>-1</sup>
<b>v</b>	Teilungsrate	d <sup>-1</sup>
<b>N<sub>0</sub></b>	Startzellzahl	Zellen·ml <sup>-1</sup>
<b>Ne</b>	Newton-Zahl	-
<b>n<sub>R</sub></b>	Rührerdrehzahl	s <sup>-1</sup>
<b>n<sub>Td</sub></b>	Anzahl der Teilungen	-
<b>P</b>	Leistung	W
<b>ρ</b>	Dichte des Mediums	Kg·m <sup>-3</sup>
<b>Re</b>	Reynoldszahl	-
<b>R<sub>P,C</sub></b>	Zelluläre Coccolithen-Produktivität	Coccolithen·Zelle <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>
<b>r<sub>Photonen, abs</sub></b>	Photonenabsorptionsrate	μmol Photonen·Zelle <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup>
<b>R<sub>P,V</sub></b>	Volumetrische Coccolithen-Produktivität	g·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>
<b>R<sub>x</sub></b>	Substrataufnahmerate	pg·Zelle <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>
<b>T</b>	Temperatur	°C
<b>t</b>	Zeitpunkt	d
<b>V</b>	Reaktorvolumen	L

# Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit am Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik - Bioverfahrenstechnik des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT).

Zuerst möchte ich Herrn Prof. Dr.-Ing. Clemens Posten für die Möglichkeit der Durchführung meiner Promotion an seinem Lehrstuhl danken. In dieser Zeit habe ich durch die unzähligen interessanten Gespräche so viel gelernt wie noch nie zuvor. Durch die Diskussionen bekam ich einen neuen Blickwinkel für viele Aspekte dieser Arbeit und war in der Lage, meine Komfortzone zu verlassen.

Ich danke auch Prof. Dr.-Ing. Matthias Franzreb für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Natürlich möchte ich auch meinen lieben Kollegen danken. Einen ganz besonderen Dank erhält Christian Steinweg, ohne den vermutlich keiner meiner Reaktoren funktioniert hätte, der stets geduldig auf mein „ich hab mal eine Frage...“ reagiert und immer eine Lösung gefunden hat. Ein riesiges Dankeschön gebührt natürlich auch dem Rest der Arbeitsgruppe Ingrida Melková, Franziska Ortiz Tena, Rosa Roselló Sastre, Kira Schediwy, Artem Kalinin und Mirco Katzenmeyer. Ich danke euch für die schöne gemeinsame Zeit und für die fachliche und seelische Unterstützung. Außerdem möchte gerne meinen fleißigen Korrekturlesern danken, die diese Arbeit lesbar gemacht haben.

Mein Dank gebührt auch den Studenten Ole Bajohr, Yang-Yang Tim Wang, Jamila Boughanmi, Luka Blümling, Melissa Ditzel, Samiye Gündüz, Vasco Welter und Anastassia Trikin, die maßgeblich an dem Erfolg dieser Arbeit mitgewirkt haben.

Ich möchte zudem meiner Familie danken – vor allem meiner Mutter. Du hast alles getan, um uns in jeder Lebenslage zu unterstützen und ohne dich wäre ich niemals die Person, die ich heute bin. Ich danke auch meinen Schwestern für die unglaubliche Geduld mir die Welt ein bisschen mehr mit ihren Augen zu zeigen.

Ich danke meinem Mann Niklas, dass er die stundenlangen Gespräche über meine Arbeit ausgehalten hat. Danke, dass du jedes Mal versucht hast mir zu helfen, obwohl du keine Ahnung mehr hattest, worüber ich rede. Danke, dass du mich in jeder Situation unterstützt und motiviert hast und so diese anstrengende Zeit so viel leichter gemacht hast.

Der letzte Absatz gilt meiner Tochter Elena. Du hast meine Welt auf den Kopf gestellt und so viel besser gemacht, da du mir jeden Tag zeigst, was wirklich wichtig im Leben ist.

Duisburg, 29.01.2024

Johanna Zander



# 1 Einleitung

## 1.1 Ausgangssituation

Der Begriff Klima bezeichnet Wetterverhältnisse wie Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Niederschlag und Windstärke innerhalb einer definierten Region für Zeitspannen von Jahren bis Jahrtausende [184]. Durch die Erweiterung des Wortes zu „Klimawandel“ wird ein ernstzunehmendes Problem der gesamten Weltbevölkerung angesprochen. Im Zuge der zunehmenden Industrialisierung im 19. Jahrhundert stieg die Menge an Treibhausgasen wie beispielsweise Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>) und Methan (CH<sub>4</sub>) in der Atmosphäre stark an, wodurch sich die Temperatur der Erde immer weiter erhöht [184]. So kann bereits eine Zunahme der globalen Oberflächentemperatur von etwa 1,2 °C verzeichnet werden [74]. Die dadurch resultierende Hitze und Trockenheit sind die idealen Voraussetzungen für das Entstehen von Waldbränden. Allein im Jahr 2023 verbrannten in Europa bis Mitte August 260.000 Hektar Wald [135].

Weit weniger Aufmerksamkeit erfahren Auswirkungen des Klimawandels auf aquatische Ökosysteme. Durch die steigende CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Luft nimmt auch die Konzentration in den Meeren zu. CO<sub>2</sub> reagiert im Wasser zu Kohlensäure und führt zum Absinken des pH-Wertes, was eine besondere Gefahr für Organismen darstellt, die ihre Schalen und Skelette aus Kalk aufbauen (Korallen, Kalkalgen und Muscheln) [1]. Des Weiteren kann eine Zunahme der Meerwassertemperatur, das Wachstum von photosynthetischen Organismen negativ beeinflusst werden. Diese Organismen sind jedoch Grund dafür, dass etwa die Hälfte des globalen, atmosphärischen Sauerstoffes aus den Ozeanen stammt [156]. Zu ihnen zählen unter anderem Mikroalgen, welche die Energie des Sonnenlichts dafür nutzen, CO<sub>2</sub> aus der Atmosphäre mittels Photosynthese in Biomasse umzuwandeln, wobei Sauerstoff als Nebenprodukt entsteht [235]. Sie sind somit unabdingbar für das menschliche Überleben auf der Erde. Mikroalgen werden zudem von Primärkonsumenten wie Zooplankton, kleinen Fischen und Krebstieren gefressen, wodurch sie die Grundlage der aquatischen Nahrungsnetze bilden [155].

Das Potential von Mikroalgen zur klimafreundlichen Stoffproduktion wurde bereits seit einigen Jahren von der Industrie und Forschung erkannt. Neben einem Einsatz als Nahrungsergänzungsmittel werden sie in der Kosmetik- und Pharmaindustrie sowie in der Aufbereitung von Abwässern eingesetzt [199, 233]. Aufgrund ihrer schnellen und hohen Biomasseproduktion bieten sie die Perspektive, sich als alternative Biomasse anstelle von terrestrischen Pflanzen zu etablieren. Da sie keinen fruchtbaren Boden benötigen, konkurrieren sie nicht um Ackerfläche für Lebens- und Futtermittel [235]. Des Weiteren enthält die Mikroalgen-Biomasse zahlreiche Nährstoffe und Vitamine, die in pflanzlichen Nahrungsquellen gar nicht (Vitamin D und B12) oder in geringeren Mengen (Folat und Eisen) vertreten sind [14]. Der Einnahme von *Chlorella* als Nahrungsergänzungsmittel werden zudem einige pharmakologische Aktivitäten nachgesagt wie einer immunmodulatorischen, antioxidativen oder blutdrucksenkenden Aktivität [14].

Auch für weitere landwirtschaftliche und ökologische Probleme bietet der Einsatz von Mikroalgen Lösungsansätze. So können beispielsweise nur 15-20 % des durch Düngemittel zugeführten

Phosphors von Kulturpflanzen aufgenommen werden [41, 56]. Der überflüssige Phosphor gelangt so in die nahegelegenen Gewässer und kann dort das Gleichgewicht des Ökosystems stören [32, 219]. Durch diesen verschwenderischen Einsatz und aufgrund der Tatsache, dass Phosphatdünger nicht aus erneuerbaren Ressourcen hergestellt wird, werden die Phosphorgesteinreserven vermutlich in den nächsten 50-90 Jahren aufgebraucht sein [39, 43, 52, 219, 240]. Mikroalgen benötigen Phosphor für ihr Wachstum und können diesen zudem in Form von Polyphosphaten in den Zellen speichern [16]. Durch Aufbringen von phosphathaltiger Algenbiomasse auf die Felder könnte der Phosphatkreislauf geschlossen werden [219]. Der bioverfügbare Phosphor würde langsam aus der Biomasse freigesetzt werden, entsprechend der Phosphoraufnahme der Pflanze [147, 219]. Zudem müsste keine Bodenbearbeitungen erfolgen, was Zeit, Arbeit und Energie spart [147, 219].

Einige Mikroalgen sind in der Lage Partikel durch Biomineralisierung zu entwickeln. Eine Gruppe bilden dabei die marinen Coccolithophoren, die mit Hilfe von Carbonat und Calcium in der Lage sind Calcit-Plättchen (Coccolithen) herzustellen und diese in eine Hülle um die Zelle anzusammeln (Coccosphäre) [186, 196, 221]. *Emiliania huxleyi* (*E. huxleyi*) macht 20-50 % der gesamten Coccolithophoren-Gemeinschaft aus und ist dadurch der bedeutendste Vertreter dieser Ordnung [138, 171, 249]. Aufgrund der hohen Dichte von Kalk sinken die Coccolithen nach Absterben der Zelle auf den Meeresgrund und können so das eingebaute CO<sub>2</sub> aus dem Carbonat dauerhaft aus der Atmosphäre entfernen [133, 138, 141, 214]. Aufgrund dieser Fähigkeit sind Coccolithophoren oftmals Bestandteil ökologischer Fragestellungen, oft im Zusammenhang mit den Auswirkungen des Klimawandels. So wurde bereits das Wachstum bei erhöhten Kultivierungstemperaturen oder der Einfluss steigender CO<sub>2</sub>-Konzentrationen auf die Coccolithenbildung untersucht [30, 221, 270]. Nur wenige Arbeitsgruppen beschäftigen sich allerdings mit dem Potential der Kalk-Partikel. So besitzen Coccolithen eine außergewöhnliche dreidimensionale Struktur, die nicht künstlich reproduziert werden kann [93]. Biogener Calcit könnte tendenziell in allen Bereichen den bisher eingesetzten Kalk ersetzen. So wäre ein Einsatz als Trägermaterial für Farben und Lacke, Füllstoffe von Tabletten, Klebstoff oder auch Zement denkbar [93]. Gerade letzteres könnte einen großen Beitrag für das Klima bedeuten: Zement wird für die Herstellung von Beton benötigt – eine moderne, haltbare und vor allem günstige Masse [226]. Aktuell wird für die Herstellung von Zement ein Gemisch aus Kalkstein und Ton verwendet. Dies wird erst vermahlen, getrocknet und anschließend bei 1450 °C gebrannt [226]. Dadurch werden weltweit jährlich 2,8 Milliarden Tonnen CO<sub>2</sub> produziert, was 8 % der globalen CO<sub>2</sub>-Emissionen entspricht [226]. Da Coccolithophoren CO<sub>2</sub> zum einen durch die Biomasseproduktion und zum anderen durch die Herstellung der Kalk-Partikel speichern, könnten sie zukünftig eine revolutionäre Rolle bei der Umstellung auf eine klimafreundliche Industriekultur spielen. Dafür ist jedoch ein Kultivierungsverfahren erforderlich, das eine Massenproduktion an Coccolithen ermöglicht und zudem wirtschaftlich tragbar ist.

## 1.2 Zielsetzung der Arbeit

Dämmstoffe sind eine Gruppe von Materialien mit geringer Wärmeleitfähigkeit, meist bestehend aus Stein- und Glaswolle oder Styropor und Polyurethan. Diese Stoffe sind kostengünstig und leicht zu verarbeiten. Sie sind jedoch auch leicht entflammbar und es besteht das Problem der Durchfeuchtung. Im Rahmen des *Zentralen Innovationsprogramm Mittelstand* (ZIM)-Projektes

EcoLith soll ein nachhaltiger, organischer Dämmstoff entwickelt werden. Coccolithen besitzen eine poröse Struktur, die Lufteinschlüsse begünstigt. Luft ist ein schlechter Wärmeleiter und dadurch Hauptbestandteil der meisten Dämmstoffe. Zudem besitzt Calciumcarbonat weitere Vorteile: Neben seiner Alkalinität zur Verhinderung von Schimmelpilzbefall ist es zudem nicht entzündbar. In vorherigen Arbeiten am Institut für Bioverfahrenstechnik am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) wurde *E. huxleyi* bereits in verschiedenen Reaktorsystemen kultiviert. Dabei konnten Coccolithenausbeuten von  $5,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  erreicht werden. Für die Herstellung einer konventionellen Wärmedämmplatte werden allerdings 25 kg Coccolithpulver benötigt. Am Beispiel dieser Aufgabe sollten in dieser Arbeit zum einen das Wachstum und zum anderen die Coccolithenproduktion von *E. huxleyi* untersucht und optimiert werden.

Zunächst soll in Versuchen im Labormaßstab (250 ml) im Satzbetrieb der Einsatz von Hell-Dunkel-Zyklen das Wachstum der *E. huxleyi* Zellen unterstützen und damit die Zellzahl steigern. Gleichzeitig kann so eine erhöhte Coccolithenausbeute erreicht werden. Dabei werden verschiedene Parameter des Mikroalgenwachstums untersucht: Zum einen wird die Dauer der Hellphase (12 und 15 Stunden) variiert. Zum anderen soll die Lichtintensität während der Hellphase variiert werden ( $60$  bis  $350 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Als Parameter zur Evaluierung des idealen Hell-Dunkel-Zyklus für ein verbessertes Wachstum dient die Zell-Konzentration. Die Ergebnisse der Versuche können im Anschluss auf Kultivierungsversuche in einem Rührkesselreaktor (1,6 L) im Repeated-Batch-Betrieb übertragen werden.

Durch die Modifikation des Kultivierungsmediums soll in einem nächsten Schritt das Wachstum und die Coccolithenproduktion optimiert werden. Hierfür wurden die Mikroalgenzellen im Labormaßstab (250 ml) bei kontinuierlichem Licht ( $350 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) und  $19 \text{ }^\circ\text{C}$  kultiviert. Da *E. huxleyi* hauptsächlich Bestandteil bioökologischer Fragestellungen ist, orientieren sich die Nährstoff-Konzentrationen des, in der einschlägigen Forschung eingesetzten *Enriched Seawater, Artificial Water* (ESAW)-Mediums, an denjenigen des Meeres und sind somit für Massenproduktion zu niedrig angesetzt. Obwohl *E. huxleyi* seit Jahrzehnten wissenschaftlich untersucht wird, sind die Funktion und intrazelluläre Produktionsmechanismen der Coccolithen weitestgehend unbekannt. Um den Einfluss verschiedener Elemente auf das Wachstum und auf die Kalzifizierung untersuchen zu können, wurden in verschiedenen Ansätzen sukzessiv die Konzentrationen aller Elemente des ESAW-Mediums erhöht. Der Verlauf der Zell- und Coccolithen-Konzentration jedes Ansatzes kann als Kriterium für die Verbesserung des Mediums eingesetzt werden. Das Medium mit den besten Ergebnissen wird im Anschluss für den nächsten Modifikationsansatz ausgewählt.

Um eine möglichst hohe Coccolithenausbeute erreichen zu können, muss im nächsten Schritt ein geeignetes Kultivierungssystem entwickelt werden. Dabei werden zwei bereits am Institut etablierte Photobioreaktorsysteme (Rührkessel (1,6 L)- und Bag-Reaktor (14 L)) sowie zwei neuartige Photobioreaktoren (Schlauch (14 L) - und Membranreaktor (1,8 L)) jeweils im Repeated-batch-Betrieb verwendet. Dabei sollen verschiedene Parameter untersucht werden, wie beispielsweise der Einfluss der Begasungsart (Oberflächen- Blasen- und Membranbegasung) und der Durchmischungen (durch Wellen, Blasen oder Rührelemente) auf die Zellen und Coccusphäre. Zudem soll auch die Reaktorgeometrie berücksichtigt werden. So besitzt der Bag-Reaktor eine sehr hohe Schichtdicke, während sie bei dem Membranreaktor nur wenige Zentimeter hoch ist. Zusätzlich

sollen im Membran- sowie Bag-Reaktor Kultivierungen im semi-kontinuierlichen Betrieb durchgeführt werde, um eine möglichst hohe Coccolithenausbeute in einem stabilen und skalierbaren Kultivierungsbetrieb zu erreichen. Als Nebenergebnis konnten Coccolithen aus all diesen Kultivierungen sowohl an die Kooperationspartner des EcoLith-Projektes als auch an das Universitätsklinikum der RWTH Aachen versandt werden. So soll zum einen der Einsatz der Coccolithen als Dämmmaterial in einer Prototyp-Wärmedämmplatte und zum anderen als Bestandteil in Knochenimplantaten untersucht werden. Die optimierten und bewerteten Kultivierungen sollen die Basis einer weiteren Skalierung und technischen Umsetzung sein, um die Mikroalgen auch für die Produktion mineralischer partikulärer Materialien einzusetzen.

# 2 Theoretische Grundlagen

## 2.1 Die Kalkalge *Emiliana huxleyi*

Eine besondere Algenordnung bilden die Coccolithophorida aus der Gruppe der Haptophyta. Sie existieren seit mindestens 220 Millionen Jahren und es sind etwa 150 Arten bekannt, die alle eine einzigartige Physiologie und Morphologie besitzen [188, 249]. *Emiliana huxleyi* (*E. huxleyi*), benannt nach dem Biologen Thomas Huxley, macht 20-50 % der gesamten Coccolithophoren-Gemeinschaft aus und ist dadurch der bedeutendste Vertreter dieser Gruppe [17, 28, 138, 171, 196, 249]. *E. huxleyi* kommt in allen Weltmeeren vor und zählt mit ihren 5-10  $\mu\text{m}$  Zelldurchmesser zu den wichtigsten Organismen im heutigen Ozean. Diese einzellige Alge kann Kohlenstoff nicht nur durch die Bildung von Biomasse fixieren, sondern auch durch die Bildung von Coccolithen (Altgriechisch. *kókkos*: Korn, Samen, *lithos*: Stein) [186, 196, 221, 251]. Coccolithen sind kleine, mikrostrukturierte Plättchen aus Calcit, die *E. huxleyi* durch Biomineralisierung herstellen kann [93]. Sie haben einen Durchmesser von etwa 2,5-3,0  $\mu\text{m}$  und wiegen ungefähr 2-3 pg [241]. 10-15 Coccolithen bilden eine Hülle um die Zelle, welche als Coccosphäre bezeichnet wird [93]. Abbildung 2.1 zeigt eine Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme einer *E. huxleyi*-Zelle sowie einzelner Coccolithen.

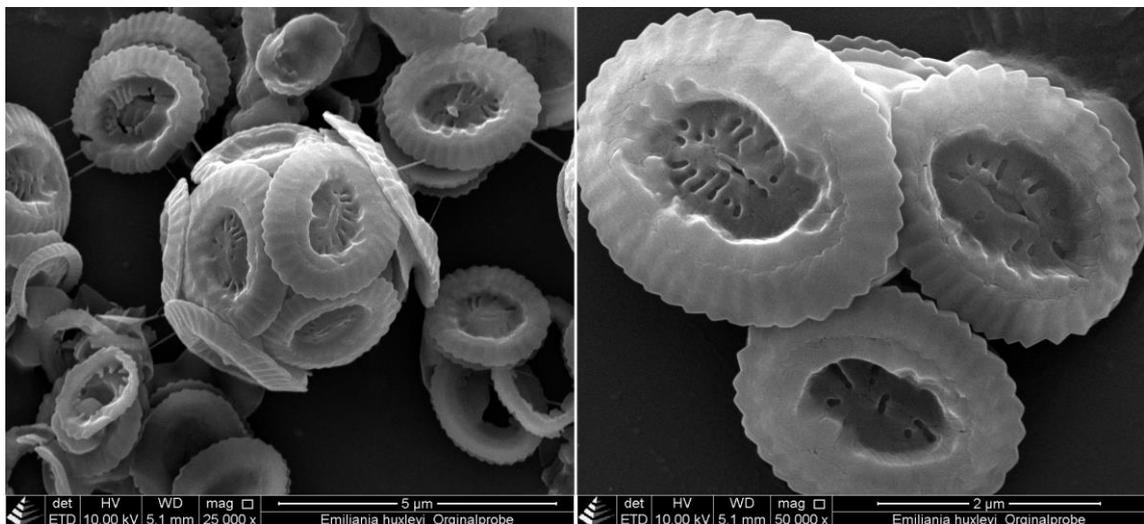


Abbildung 2.1 Links: *Emiliana huxleyi*-Zelle mit Coccolithen, Rechts: Einzelne Coccolithen (Fotos von: Dr. Birgit Hetzer, Insti-tut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik, Max Rubner-Institut, Karlsruhe)

Durch die Bildung der Calcit-Partikel spielt *E. huxleyi* eine bedeutsame Rolle in den marinen biochemischen Kreisläufen [17, 28, 138, 171, 249]. Aufgrund der stetig zunehmenden Emission fossiler Brennstoffe und durch die Abholzung von Wäldern nimmt die atmosphärische  $\text{CO}_2$ -Konzentration immer weiter zu. Dies führt zu einem Anstieg der globalen Durchschnittstemperatur und zu Veränderungen der Carbonatchemie der Ozeane [176, 255]. Aufgrund der Fixierung von

gelösten  $\text{CO}_2$  durch die Photosynthese nimmt die Konzentration des Gesamtkohlendioxids sowie der anorganischen Nährstoffe im Meer ab. Infolge dieser  $\text{CO}_2$ -Aufnahme wird der  $\Delta p_{\text{CO}_2}$ -Gradient erhöht, welcher die Differenz der Partialdrücke von  $\text{CO}_2$  in der Luft und im Meerwasser beschreibt und die treibende Kraft des  $\text{CO}_2$ -Gasaustauschs ist [10, 270]. Der Ozean nimmt so mehr als ein Viertel der  $\text{CO}_2$ -Emissionen auf und kann dadurch die globale Erwärmung abschwächen [70, 165].

Coccolithophore haben die Besonderheit, dass sie  $\text{CO}_2$  auf zwei Arten binden können. Zum einen wird  $\text{CO}_2$  durch die Photosynthese zum Wachstum benötigt. Zum anderen verwendet *E. huxleyi* vermutlich Hydrogencarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ) als Substrat für die Kalzifizierung [160]. Die Kalzifizierung kann dazu beitragen, Kohlenstoff aus dem Kreislauf zu entfernen, indem die Coccolithen in die Tiefsee transportiert werden. Dieser Effekt tritt auf, wenn die Coccolithen nach dem Tod der Zelle oder in Verbindung mit Fäkalien absinken und dadurch einen bedeutenden Teil der pelagischen Sedimente bilden [133, 138, 141, 214]. Dieses abgelagerte  $\text{CaCO}_3$  kann durch Rifting- und Gebirgsbildungsepisoden wieder der Erosion ausgesetzt werden [194].

Aufgrund der globalen Entwicklungen ist jedoch unklar, ob dieser Kreislauf weiterexistieren kann. So nahm beispielsweise das Vorkommen von *E. huxleyi* in den Polarmeeren zu. Während in den 1940er Jahren keine Coccolithophoren nachgewiesen werden konnten, ist *E. huxleyi* heutzutage eine weitverbreitete polare Spezies [254]. Dies könnte entweder durch Meeresströmungen verursacht worden sein oder durch die Veränderung der Meerestemperatur [254]. Während in den 80er Jahren die Durchschnittstemperatur der Meeresoberfläche noch bei maximal  $20,5\text{ }^\circ\text{C}$  lag, so erreichte sie im April 2023 mit  $21,1\text{ }^\circ\text{C}$  einen neuen Höchstwert [38]. Höchstwahrscheinlich wird sich die Durchschnittstemperatur allein in der Arktis bis zum Jahr 2100 ebenfalls um  $2\text{--}9\text{ }^\circ\text{C}$  erhöhen [165, 176]. Diese Temperaturerhöhung könnte den Stoffwechsel vieler mariner Organismen beeinflussen und unvorhergesehene Folgen für die Funktion des Ökosystems haben [67, 209, 228]. Doch nicht nur der Stoffwechsel, sondern auch die Durchmischung der Meeresschichten wird beeinflusst. Wenn sich die Oberflächengewässer erwärmen, nimmt die Schichtung des Meeres zu (beispielsweise durch vertikale Dichtegradienten). Dadurch verringert sich der vertikale Wassermassenaustausch und infolgedessen auch der Nährstoffaustausch mit der Tiefsee. Außerdem erhöht sich die mittlere Bestrahlungsstärke, welche die Organismen erfahren, da die Durchmischungstiefe geringer ist [67]. Zudem wird sich durch die Hydrolyse von  $\text{CO}_2$  die Wasserstoffionenkonzentration ( $\text{H}^+$ ) erhöhen, wodurch der pH-Wert des Meeres sinkt [165].

*Emiliania huxleyi* ist für ihre Blüte bekannt, die selbst aus dem Weltall beobachtet werden kann. Die Coccolithen können das Licht streuen und wirken wie kleine Spiegel, die im Wasser verstreut sind und dem Meerwasser eine weiße Färbung verleihen [82, 84, 237]. Dieses Phänomen ist an den unterschiedlichsten Orten beobachtet worden, wie beispielsweise in den Fjorden von Norwegen, in der Nordsee, im Ärmelkanal oder auch im Nordatlantik [12, 31, 66, 79, 82–84, 111, 115, 131, 242]. Die Zell-Konzentrationen, die dabei erreicht wurden, reichen von  $0,1 \cdot 10^6$  Zellen  $\cdot \text{L}^{-1}$  bis hin zu  $115 \cdot 10^6$  Zellen  $\cdot \text{L}^{-1}$  [6, 12, 25, 84, 234, 238]. Es existieren viele Vermutungen, durch welche Umweltbedingungen eine Algenblüte ausgelöst werden kann, jedoch ist dieses Phänomen trotz ausführlicher Forschung bis heute nicht geklärt. Nach den Blüten bleiben zahlreiche abgelöste Coccolithen zurück, die die optischen Eigenschaften und auch die ökologische Dynamik der

gemischten Ozeanschichten beeinflussen können [26, 237, 254]. So wird das Oberflächengewässer beispielsweise wärmer und die tieferen Wasserschichten werden geringer erwärmt, wodurch sich die Stärke der Schichtung erhöht und die Durchmischung verringert wird [237]. Dadurch wird der Aufwärtsfluss von Nährstoffen gehemmt [237].

## 2.2 Die Kalzifizierung

Die Kalzifizierung der Coccolithophoren ist ein lang untersuchter Prozess, doch bis heute ist ihre eigentliche Funktion nicht geklärt [188]. So existiert, die Vermutung, dass die Coccolithen die Umgebungstemperatur des Wassers durch Lichtstreuung erhöhen, um eine Temperatur von etwa 18 °C zu erreichen [249]. Andere Arbeitsgruppen sehen in den Coccolithen einen Schutz vor ultraviolettem Licht, da die Alge oft nah an der Wasseroberfläche zu finden ist [186]. Möglicherweise ist die Fähigkeit zur Coccolithenbildung auch ein evolutionäres Überbleibsel. Die Calciumkonzentrationen in den Ozeanen waren zur Kreidezeit deutlich höher, als sie es heute sind [149]. So kann die Kalzifizierung ein Mechanismus sein, um hohe externe Calciumkonzentrationen überleben zu können [149]. In den Versuchen von Müller et al. zeigten nicht-kalzifizierende Zellen ein verschlechtertes Wachstum bei erhöhten Calciumkonzentrationen, während kalzifizierende Spezies ihr Wachstum aufrecht erhalten konnten [149]. Dies liegt vermutlich daran, dass die Zellen ohne Coccolithenbildung keine Möglichkeit besitzen einer zellulären Calciumvergiftung entgegenzuwirken [149]. Doch all diese Erklärungen können einer vertieften Betrachtung nicht standhalten.

Die Verkalkung findet im Coccolithvesikel statt. Es stammt vermutlich vom Golgi-Apparat, liegt eng an der Kernhülle an und besitzt eine komplexe Beziehung zum Endomembransystem [229, 241, 250]. Das Endomembransystem ist höchstwahrscheinlich für die Bereitstellung der anorganischen und organischen Substrate verantwortlich [229].

Coccolithen werden nach Gleichung 2.1. gebildet [5, 133]:



In der Zelle liegen  $\text{HCO}_3^-$  und  $\text{CO}_2$  durch die Aktivität der Carboanhydrase im chemischen Gleichgewicht [89]. In Versuchen mit  $^{14}\text{C}$  markiertem  $\text{HCO}_3^-$  konnten Sikes et al. [214] beobachten, dass der Kohlenstoff in kalzifizierenden Zellen von *E. huxleyi* als erstes in den Coccolithen fixiert wurde. Erst nach einer Verzögerung konnte eine Fixierung durch die Photosynthese festgestellt werden. In einem weiteren Experiment der Arbeitsgruppe wurde den Zellen  $^{14}\text{C}$  in Form von  $^{14}\text{CO}_2$  zur Verfügung gestellt. Die Folge war, eine hohe Photosyntheserate, doch auch die Coccolithenbildungsrate stieg im Verlauf des Versuches an. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass  $\text{HCO}_3^-$  die Kohlenstoffquelle der Coccolithenbildung ist, während  $\text{CO}_2$  sowohl der Photosynthese als auch der Coccolithenproduktion zugeführt werden kann [214]. Doch die Kalzifizierung scheint die Photosynthese trotzdem unterstützen zu können. So wird nach Gleichung 2.1. für jedes Mol  $\text{CaCO}_3$  ein Mol  $\text{CO}_2$  gebildet, das als Substrat für RuBisCo verwendet werden könnte [28]. Verschiedene Arbeitsgruppen schlagen daher vor, dass ein Hauptvorteil der Coccolithenbildung darin besteht,  $\text{CO}_2$  für die Photosynthese zurückzuführen [160, 214]. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass stark kalzifizierende Zellen ihr Wachstum beibehalten, wenn in die Kultur

CO<sub>2</sub>-freie Luft (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> war in Medium vorhanden) eingebracht wird, wohingegen niedrig-kalzifizierende Stämme das Wachstum nicht aufrechterhalten können [5, 28, 161, 162]. Neuere Studien scheinen diese Theorie allerdings zu widerlegen. Herfort et al. [80] inkubierten *Emiliana huxleyi* bei unterschiedlichen Calciumkonzentrationen. Dabei zeigten die Kalzifizierungs- und Photosyntheseraten unterschiedliche Kinetiken. Während die Kalzifizierungsrate positiv mit den Calciumkonzentrationen korrelierte, blieb die Photosyntheserate über einen weiten Bereich konstant, was zeigt, dass die Kalzifizierung die Photosynthese nicht stimuliert [80]. Da HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> als Substrat für die Kalzifizierung gilt, muss es über die Plasmamembran in das Cytosol transportiert werden. Der Mechanismus dieses Transportes ist bei *E. huxleyi* nicht bekannt. Möglichkeiten für diesen Transport könnte beispielsweise ein HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/Cl<sup>-</sup>-Austausch, ein HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/OH<sup>-</sup>-Austausch oder ein Co-Transport mit einem Kation, wie Na<sup>+</sup> sein [28]. Diese wurden bereits in anderen Algenarten (*Phaeodactylum tricorutum*, *Dunaliella salina*) beobachtet [47, 104, 190]. Im Cytosol kann HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> dann auf drei verschiedene Arten weiter reagieren. Zum einen kann es mit dem cytosolischen H<sup>+</sup> reagieren und so CO<sub>2</sub> freisetzen. Es kann in den Chloroplasten eintreten, wo durch die Wirkung der Carboanhydrase CO<sub>2</sub> produziert wird oder es kann in das Coccolithvesikel gebracht werden und dort H<sup>+</sup> freisetzen, wodurch CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> entsteht [5, 28, 153]. Dieses entstehende Proton muss in das Cytosol entfernt werden, um eine Ansäuerung des Vesikels und somit eine Hemmung der CaCO<sub>3</sub>-Fällung zu verhindern [5]. Dies könnte durch eine nach außen gerichtete H<sup>+</sup>-Pumpe in der Membran des Vesikels ermöglicht werden [28].

Da Calcium in vielen Signaltransduktionsprozessen involviert ist, ist eine strenge Regulierung des freien cytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Spiegels notwendig [128]. Ca<sup>2+</sup> diffundiert vermutlich über die Plasmamembran entlang eines elektrochemischen Gradienten durch noch unbekannte Ca<sup>2+</sup>-durchlässige Kanäle in das Cytosol [128]. Wahrscheinlich wird Ca<sup>2+</sup> dann durch Ionenaustauscher wie beispielsweise Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> oder Ca<sup>2+</sup>/Na<sup>+</sup> in ein Coccolith-Vesikel-Vorläufer gebracht und von dort dann für die Kalzifizierungsreaktion verwendet [128].

Die Coccolithen bestehen zu 86 % aus Calciumcarbonat [93]. Die restlichen 14 % setzen sich hauptsächlich aus Magnesium und Silizium sowie geringere Anteile weitere Elemente zusammen [93]. Tabelle 2.1 enthält eine Übersicht der chemischen Zusammensetzung von Coccolithen, welche jedoch stark vom Medium abhängig ist.

Tabelle 2.1: Chemische Zusammensetzung von Coccolithen nach [93]

<b>O</b>	85,1 %	<b>K<sub>2</sub>O</b>	0,006 %	<b>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b>	0,392 %
<b>MgO</b>	6,4 %	<b>TiO<sub>2</sub></b>	0,004 %	<b>Mn<sub>3</sub>O<sub>4</sub></b>	0,038 %
<b>SiO<sub>2</sub></b>	6,6 %	<b>Na<sub>2</sub>O</b>	0,222 %	<b>SO<sub>4</sub></b>	0,038 %
<b>Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	0,15 %	<b>SrO</b>	0,606 %	<b>Σ</b>	100 %
<b>Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	0,37 %	<b>BaO</b>	0,004 %	<b>CaCO<sub>3</sub></b>	86 %

Fertige Coccolithen bestehen aus vier Untereinheiten. Das abgeflachte *proximal shield element* ist etwa 1 µm lang, während das *distal shield element* hammerförmig und etwa 0,6 µm lang ist [80]. Es ist durch eine vertikale Verlängerung über das *inner tube element* mit dem *central area element* verbunden [80]. Die einzelnen Elemente sind in Abbildung 2.2 zu sehen.

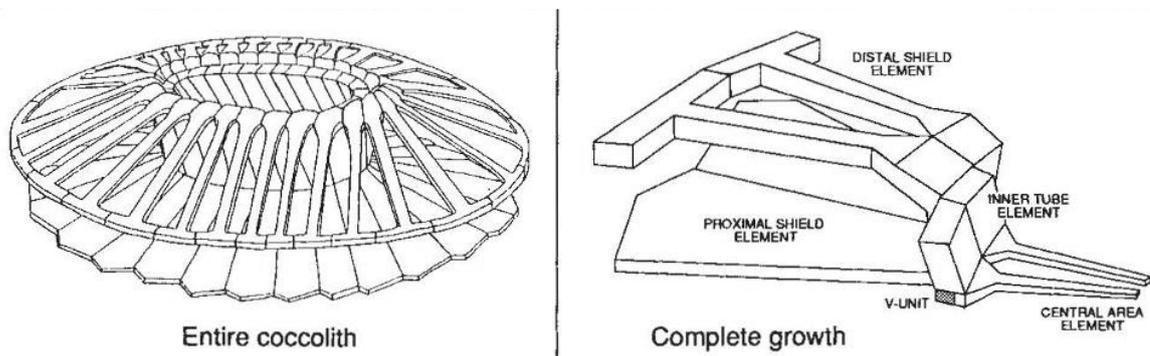


Abbildung 2.2: Untereinheiten einer Coccolithe (aus [261])

Sobald die Coccolithen fertiggestellt sind, werden sie in das Exoskelett, der sogenannten Cocosphäre eingebaut [80, 250]. Dort verzahnen sie sich etwa 10-15 Coccolithen zu einer kugelförmigen Schale um die Zelle herum [93, 252]. Das Auswerfen der Coccolithen durch die Cytoplasmamembran wurde bisher jedoch nicht beschrieben [171].

Der Porendurchmesser der Coccolithen lag bei den Untersuchungen von Jakob et al. bei 3,7 nm [93]. Sie besitzen weiterhin ein Gesamtporenvolumen von  $0,05 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$  und eine spezifische Oberfläche von  $19 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  [93]. Die Pulverdichte beträgt  $2,6 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$  und ist somit niedriger als die von reinem Calcit ( $2,715 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ) [93].

## 2.3 Der Zellzyklus

Der Zellzyklus lässt sich in vier Phasen unterteilen:  $G_1$ -Phase, S-Phase,  $G_2$ -Phase und Mitose (siehe Abbildung 2.3) [108]. In der  $G_1$ -Phase (G: *gap* (*Lücke*)) ist die Zelle diploid, wächst und synthetisiert Strukturen, wie Proteine, Membranlipide und Bausteine für die Nukleinsynthese [126]. Wenn Substratmangel herrscht oder Wachstumsfaktoren fehlen, kann die Zelle in die  $G_0$ -Phase eintreten und dort sehr lange verweilen [126]. Die Zellen sind die meiste Zeit in der  $G_1$ -Phase und der Kern ist teilungsinaktiv [181]. In dieser Zeit führen die Zellen ihre spezifischen Stoffwechsellleistungen durch und nehmen an Masse beziehungsweise Volumen zu [181]. Um den Zellzyklus weiter fortzuführen, muss die Zelle die  $G_1$ -Phase beenden. Das Ende ist durch den R-Punkt festgelegt [108, 263]. Der R-Punkt steht für Restriktion [108]. Bevor dieser Punkt erreicht wird, besitzt die Zelle die Möglichkeit die Proliferation zu pausieren ( $G_0$ - beziehungsweise prolongierte  $G_1$ -Phase) [108]. Dies geschieht beispielsweise wenn aufgrund von Nährstoff- oder Energiespeicher-Mangel eine vollständige Teilung noch nicht möglich wäre. Sobald dieser Punkt jedoch überschritten wurde, ist die Zelle dazu verpflichtet die Prozesse der Zellteilung durchzuführen und zu beenden [263]. Anschließend gelangt die Zelle in die S-Phase (S: *Synthese*). In dieser Phase findet die DNS-Replikation statt, wodurch die Zelle am Ende dieser Phase tetraploid ist [40, 100, 126]. Dieser Phase folgt die  $G_2$ -Phase, die häufig relativ kurz ist [126]. Diese Phase befindet sich zwischen der DNS-Replikation und dem Beginn der Mitose [263]. Während der  $G_2$ -Phase zerfällt die Kernlamina, zudem kommt es zu einer Reorganisation des Cytoskeletts [126]. Darüber hinaus finden in dieser Phase vermutlich die Prozesse statt, die zur Einleitung der M-Phase (M: *Mitose*) notwendig sind [263]. Die Mitose wiederum besteht aus sieben Phasen [152].

In der ersten Phase, der Prophase, kondensieren die Chromosomen [152]. Diese Phase beansprucht etwa die Hälfte der gesamten Mitosedauer [181]. In der Prometaphase wird der Spindelapparat aufgebaut und die Kernmembran löst sich auf [152]. Die Chromosomen werden anschließend in der Metaphase auf der Äquatorialebene angeordnet und die Chromatiden eines Chromosoms in der Anaphase voneinander getrennt [152]. Diese beiden Phasen benötigen für ihre Durchführung nur wenige Minuten [181]. In der Telophase entstehen dann schlussendlich die neuen Tochterkerne [152]. Während der Mitose bleibt in Algen die Kernmembran im Gegensatz zu höheren Eukaryoten erhalten, weshalb es sich um eine geschlossene Mitose handelt [152]. Parallel zu den letzten Phasen der Mitose findet die Cytokinese statt [152]. Die Teilungsebene liegt auf halbem Weg zwischen den Spindelpolen und vermutlich besitzen beide Tochterzellen etwa die gleichen Anteile der cytoplasmatischen Bestandteile (Mitochondrien, Plastiden, etc.) und das selbe Volumen [152]. Es existieren verschiedene Mechanismen, wie die Cytokinese stattfinden kann.

Tabelle 2.2: Zusammenfassung verschiedener Zellteilungsformen (nach [151])

<b>Mechanismus</b>	<b>Definition</b>
Binäre Spaltung	Teilung in zwei gleiche Zellen
Asymmetrische Spaltung	Teilung in zwei ungleiche Zellen
Multiple Spaltung	Teilung einer Zelle durch mehrere binären Spaltungen
Ternäre Spaltung	Teilung einer Zelle in drei Zellen
Knospung	Teilung durch Bildung eines Auswuchses aus der Mutterzelle

Wie Tabelle 2.2 zeigt, weisen Algen eine große Vielfalt an Zellreproduktionsmustern auf [208]. So können beispielsweise einige Arten unter verschiedenen Wachstumsbedingungen oder in verschiedenen Phasen des Lebenszyklus eine binäre Spaltung, multiple Spaltung und auch einen Übergang zwischen binärer- und multipler Spaltung aufweisen [208]. Die binäre Spaltung entspricht dem klassischen Ablauf des Zellzyklus, wobei sich eine Mutterzelle in zwei Tochterzellen teilt [263]. Der Ablauf ist in Abbildung 2.3 dargestellt.

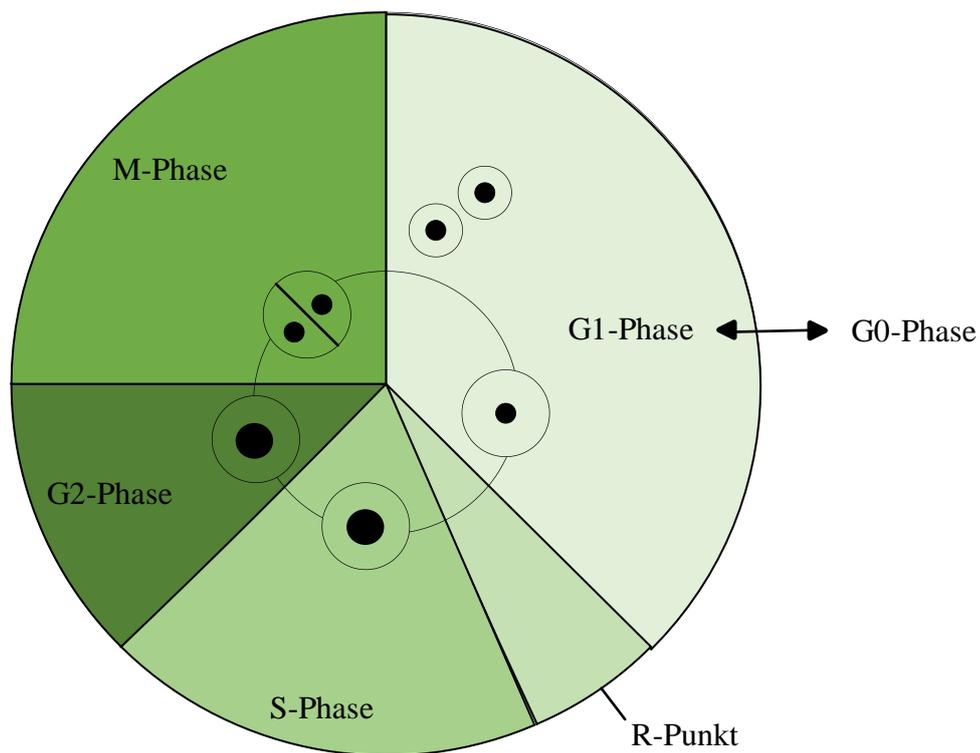


Abbildung 2.3: Binäre Spaltung (nach [87, 126, 263])

Während die Länge der  $G_1$ -Phase von der Nährstoff- und Lichtverfügbarkeit abhängt, läuft der restliche Zellzyklus mit einer festgelegten Geschwindigkeit ab, die für jeden Organismus spezifisch ist und angepasst werden kann [146, 263]. Beispielsweise konnte durch Forschungsarbeiten an der Grünalge *Scenedesmus* der Zyklus durch eine Vorreplikationsphase um eine  $G_3$ -Phase ergänzt werden [263]. Weiterhin ist bemerkenswert, dass während der Zellteilung keine Photosynthese stattfindet. Die Zellen teilen sich deshalb bevorzugt nachts, können sich aber auch tagsüber teilen.

Wie in Tabelle 2.2 aufgelistet ist, sind einige Organismen dazu befähigt sich in mehr als zwei Tochterzellen zu teilen. Dieser Vorgang wird als Mehrfachspaltung oder multiple Spaltung bezeichnet [151, 263]. Dies konnte beispielsweise bei den Algenstämmen *Chlorella*, *Desmodesmus* und *Chlamydomonas* beobachtet werden [263]. Diese Art der Spaltung ist deutlich komplexer als die binäre Teilung und benötigt eine Reihe von Modifikationen [263]. Dazu gehört zum Beispiel die Tatsache, dass sich die DNS-Replikation, Mitose und Zellteilung weitgehend überlappen müssen, zudem werden auch mehrere R-Punkte benötigt [263]. Ab dem R-Punkt bis zur Bildung der Tochterzellen kann der Prozess ohne externe Energieversorgung und ohne weiteres Wachstum der Zelle durchlaufen werden [263]. Wenn jedoch ausreichend Energie zugeführt wird, können mehrere R-Punkte erreicht werden, was zu einer höheren Anzahl an Tochterzellen führt [263].

*E. huxleyi* hingegen vollzieht eine binäre Teilung [109]. Zuerst werden die Chloroplasten vermehrt, die dadurch von zwei auf vier ansteigen [106]. Die Zelle nimmt anschließend eine längliche Form an und äquatorial bildet sich eine Einschnürung [106]. Auch die Coccolithenhülle wird

eingeschnürt, solange diese nicht zu dick und steif ist [106]. Beide Tochterzellen sind dann nur noch durch einen sehr dünnen Plasmastrang verbunden, der bald darauf bricht [106].

## 2.4 Bisherige Kultivierungsverfahren

Die Kultivierung von Mikroalgen benötigt Licht, CO<sub>2</sub>, Wasser und anorganische Salze [35]. Da die Installation von künstlichen Lichtquellen teuer ist, scheint die Nutzung von Sonnenenergie, zumindest für preiswerte Massenprodukte, die einzige Möglichkeit zu sein, eine kommerzielle Produktion zu erreichen [164].

Grundsätzlich können Photobioreaktoren in zwei Kategorien eingeteilt werden: geschlossene und offene Systeme. *Open Ponds*, zu denen auch die *Raceway Ponds* gehören, werden bereits seit den 1950er Jahren für die Kultivierung von Mikroalgen verwendet [35]. Darunter fallen natürliche Gewässer, wie Seen und Teiche, aber auch künstliche Teiche oder Behälter, die sich oft in der Nähe von Kraftwerken mit hohem CO<sub>2</sub>-Ausstoß befinden [199]. Die optimale Teichtiefe liegt bei 15-50 cm [24, 35, 199]. *Raceway Ponds* besitzen eine Zirkulationsschleife mit einem geschlossenen Kreislauf und werden durch ein Schaufelrad durchmischt, das durchgehend arbeitet, um Sedimentationen zu verhindern [35]. Offene Systeme können nur über Verdunstung gekühlt werden, wodurch die Temperatur je nach Tageszyklus und Jahreszeit schwankt [35]. Sie sind zudem anfällig für Verschmutzungen, Kontaminationen und Verdunstung [199]. Außerdem können die CO<sub>2</sub>-Konzentrationen und Lichtintensitäten nicht kontrolliert werden [199]. Ein Vorteil besteht jedoch darin, dass dieses Reaktorsystem günstig ist, da die Bau- und Betriebskosten niedriger sind [35]. Sie erreichen im Vergleich zu geschlossenen Systemen jedoch niedrigere Biomassekonzentrationen [35]. Nichtsdestotrotz stellen *Raceway Ponds* nach wie vor die Hauptproduktionsanlagen dar.

Geschlossene Reaktorsysteme sollen die Probleme der offenen Systeme überwinden und beispielsweise der Verschmutzung und Kontamination entgegenwirken, wodurch hochwertige Produkte hergestellt werden können [239]. Des Weiteren können höhere Flächen-Produktivitäten erreicht werden und ein Wasserverlust durch Verdunstung wird vermieden [183]. Geschlossene Reaktoren sind beispielsweise Rohr-, Flachplatten- und Säulen-Photobioreaktoren [24]. Für die Konstruktion eines Rohrreaktors werden beispielsweise Rohre aus Glas und Kunststoff verwendet [239]. Diese Röhren haben einen Durchmesser von 0,1 m oder weniger, da das Licht sonst nicht tief genug in dichte Kulturbrühen eindringen kann [35]. Die Rohre sind oft horizontal angeordnet. Werden sie jedoch aus einem flexiblen Kunststoff hergestellt, können sie auch um einen Tragerahmen gewickelt werden [35]. Durch eine starke turbulente Strömung wird die Sedimentation verhindert, allerdings muss dieses System während der Kultivierung gekühlt werden [35]. Die Kühlung, das Wandmaterial und die Aufstellung führen dazu, dass die Kosten für geschlossene Bioreaktoren deutlich höher als die von offenen Systemen sind [33].

Auch *Emiliania huxleyi* wurde bereits in verschiedenen Reaktorsystemen kultiviert. Eine Zusammenfassung der relevanten Ergebnisse wird in dargestellt.

Tabelle 2.3: Zusammenfassung der bereits durchgeführten Kultivierungen von *E. huxleyi* in Photobioreaktoren

	Platten-Reaktor [144]	Carboy-Reaktor [144]	Airlift-Reaktor [144]	Rührkessel- Reaktor [75]	Rührkessel- Reaktor [95]	Bag-Reaktor [95]
Reaktorvolumen [L]	6	12	3	1,6	1,6	20
Maximale Zellzahl [Zellen·ml <sup>-1</sup> ]	5,9·10 <sup>5</sup>	6,9·10 <sup>5</sup>	-	3,1·10 <sup>7</sup>	2,9·10 <sup>7</sup>	1,6·10 <sup>7</sup>
Wachstumsrate [d <sup>-1</sup> ]	0,99	0,54	-	0,65	0,71	0,62
Coccolithen-Konzentration [Coccolithen·ml <sup>-1</sup> ]	-	-	-	3,5·10 <sup>8</sup>	-	-
CaCO <sub>3</sub> -Produktivität [mg·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> ]	59	29,1	-	-	270	320
Photonenflussdichte [μmol·m <sup>-2</sup> ·s <sup>-1</sup> ]	320 (12:12-HD-Zyklus)	350 (12:12-HD-Zyklus)	300 (12:12-HD-Zyklus)	350 (kontinuierlich)	350 (kontinuierlich)	350 (kontinuierlich)
Begasung	-	-	-	1 % CO <sub>2</sub> 0,03 vvm	5 % CO <sub>2</sub> 0,05 vvm	1 % CO <sub>2</sub> 0,1 vvm
Coccolithenausbeute [g·L <sup>-1</sup> ]	-	-	-	-	5,1	3,8

HD-Zyklus: Hell-Dunkel-Zyklus



# 3 Material und Methoden

Alle in dieser Arbeit verwendeten Geräte, Chemikalien und Analyse-Kits sind im Anhang Kapitel 7.2 zusammengefasst.

## 3.1 Algenstämme

In dieser Arbeit werden drei verschiedene *Emiliania huxleyi* Stämme verwendet. Die beiden kalzifizierenden Stämme CCMP3266 (hoch kalzifizierend) und CCMP371 (niedrig kalzifizierend) wurden aus der Stammsammlung des National Center for Marine Algae and Microbiota Bigelow, USA erworben [76]. Der nicht-kalzifizierende Mikroalgenstamm RCC1217 stammte aus der Roscoff Culture Collection in Frankreich. Dabei handelt es sich um die haploide Form des Stammes CCMP3266. Dieser Stamm ist nicht axenisch und zeigte in den Versuchen eine geringe Viabilität.

Tabelle 3.1: Übersicht der verwendeten Algenstämme

	<b>CCMP3266</b>	<b>CCMP371</b>	<b>RCC1217</b>
Isolation	-42.3°N 169.83°W Tasmansee	32°N -62°W Sargassosee	-42.3°N 169.83°W Tasmansee
Kalzifizierend	ja	ja	nein

## 3.2 Stammhaltung und Vorkulturen

### 3.2.1 Medium

Als Stammhaltungsmedium wird das *Enriched Seawater, Artificial Water* (ESAW) verwendet. Dabei handelte es sich um ein künstliches Meerwasser nach Harrison et al., welches von Berges et al. modifiziert wurde [13, 77]. Dieses Medium hat gegenüber dem natürlichen Meerwasser den Vorteil, dass die Bestandteile immer gleich sind und die Versuche somit reproduzierbar sind [13]. Zudem können die Mikro- und Makroelemente sowie die Vitamine je nach Bedarf dazu gemischt werden. Die genaue Zusammensetzung und Herstellung sind im Anhang (Tabelle 7.2) zu finden.

### 3.2.2 Stammhaltung

Die Algenstämme wurden als Flüssigkulturen von den Stammbanken verschickt. Nach Ankunft im Institut werden die Stämme für 24 h bei 19 °C und einer Photonenflussdichte (PFD) von  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  inkubiert. Es wird ein steuerbares Lichtmodul mit warm-weißer LED-Beleuchtung verwendet, das auf einem Rotationsschüttler montiert ist und eine effektive Beleuchtung von unten erlaubt. Nach Ablauf der 24 h werden unter der Sterilbank 25 ml der Kulturen in 250 ml

steriles und temperiertes ESAW-Medium gegeben, was sich in einem autoklavierten 500 ml Erlenmeyerkolben mit Zellulosestopfen befindet. Anschließend wird die Photonenflussdichte stündlich um  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  erhöht, bis die finale Lichtintensität von  $350 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  erreicht wird. Zusätzlich werden die Kolben bei 100 rpm auf einem Rotationsschüttler geschüttelt. Nach Erreichen der finalen PFD werden wöchentlich unter sterilen Bedingungen 5 ml der Kultur in frisches ESAW-Medium gegeben. Dadurch können die Kulturen über Monate hinweg am Leben gehalten werden.

Für die Schüttelkolben- und Reaktorversuche werden bei der Stammhaltung weitere Kolben als Vorkultur angesetzt. Dabei wird die Vorkultur so angesetzt, dass bei den Schüttelkolbenversuchen eine Animpfzellichte von  $1\cdot 10^4$  Zellen $\cdot\text{ml}^{-1}$  erreicht wird. Bei den Reaktorversuchen soll die Vorkultur etwa 10 % des Reaktorvolumens ausmachen.

### 3.3 Schüttelkolbenversuche

Aufgrund der einfachen Anwendung und der Möglichkeit mehrere Ansätze parallel zu kultivieren, werden die Vorversuche in Schüttelkolben durchgeführt. Basierend auf diesen Ergebnissen, werden die Parameter für die späteren Reaktorkultivierungen ausgewählt.

#### 3.3.1 Hell-Dunkel-Zyklen

Für die Untersuchung des Einflusses von Hell-Dunkel-Zyklen auf das Wachstum und die Kalzifizierung von *E. huxleyi* werden die Stämme CCMP3266, CCMP371 und RCC1217 verwendet. Vierzehn Tage vor Versuchsbeginn werden die Kulturen an ihre jeweiligen Beleuchtungsbedingungen adaptiert. Dafür werden die Kolben voneinander abgeschirmt, um eine gegenseitige Lichtbeeinflussung ausschließen zu können. Die Stammhaltung wird weiterhin wöchentlich durchgeführt.

Insgesamt werden vier Lichtbedingungen getestet (siehe Tabelle 3.2) Jede Versuchsreihe wird in Dreifachbestimmung angesetzt. Dafür werden sterile 500 ml Erlenmeyerkolben mit jeweils 250 ml frischen ESAW-Medium verwendet. Am Versuchstag werden alle Kolben mit einer Zelldichte von  $1\cdot 10^4$  Zellen $\cdot\text{ml}^{-1}$  beimpft und bei  $19^\circ\text{C}$  und 100 rpm inkubiert. Von diesem Zeitpunkt an werden täglich die Zellzahl, Zellgröße und Coccolithen-Konzentration in der Hell-Phase bestimmt. Sobald die Zellzahl zwei Tage in Folge abnimmt, wird das Ende der Versuchsreihe beschlossen. Aus diesen Kolben werden dann der Nährstoffverbrauch an Nitrat, Phosphat und Calcium sowie der pH-Wert gemessen.

Tabelle 3.2: Übersicht der Ansätze des Hell-Dunkel-Versuches im Schüttelkolben

Bezeichnung	Lichtbedingungen	Photonenflussdichte [ $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ]
12:12-Zyklus	12 h Licht- und 12 h Dunkelphase	350
350 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ permanent	Kontinuierliche Beleuchtung	350
220 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ permanent	Kontinuierliche Beleuchtung	220
15:9-Zyklus	15 h Licht- und 9 h Dunkelphase	350

### 3.3.2 Variation der Photonflussdichte

Sterile 500 ml Erlenmeyerkolben mit autoklaviertem ESAW-Medium werden mit  $1\cdot 10^4$  Zellen·ml<sup>-1</sup> des Stammes CCMP3266 beimpft. Anschließend werden die Kolben bei 19 °C und 100 rpm mit verschiedenen Photonflussdichten inkubiert. Getestet werden folgende Photonflussdichten: 60, 100, 220 und 350  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Die Kolben werden voneinander abgeschirmt, damit sie sich nicht gegenseitig beeinflussen. Der Versuch wird in einer Dreifachbestimmung durchgeführt. Täglich werden die Zell- und Coccolithen-Konzentration bestimmt. Zu Versuchsende werden der Verbrauch an Nitrat, Phosphat und Calcium sowie der pH-Wert gemessen.

### 3.3.3 Optimierung des Mediums

Die Versuche zur Optimierung des Mediums werden mit  $1\cdot 10^4$  Zellen·ml<sup>-1</sup> des Stammes CCMP3266 mit sterilen 500 ml Erlenmeyerkolben in Dreifachbestimmung bei 19 °C und 100 rpm durchgeführt. Als Ausgangsmedium wird das ESAW-Medium verwendet, welches dann kontinuierlich verändert wird. Dabei wird der Ansatz, der die besten Ergebnisse liefert, als Basis für die nächste Optimierung verwendet. So ergeben sich insgesamt 7 Modifikationen des Mediums, die in Tabelle 3.3 beschrieben sind. Stocklösungen, die in den Ansätzen nicht benannt werden, wurden zu dem Zeitpunkt nicht verändert und entsprechen den Konzentrationen des ESAW-Mediums (siehe Kapitel 7.2.2). Eine genaue Übersicht aller Elemente und Konzentrationen während der Modifikation des Mediums ist im Anhang Kapitel 7.2.2, Tabelle 7.5 zu finden. Alle Versuchsansätze werden in Dreifachbestimmung durchgeführt.

Tabelle 3.3: Überblick aller Modifikationen des ESAW-Mediums

<b>Ansatz</b>	<b>Modifikation</b>
1	Veränderung der Stickstoffquelle: $\text{NaNO}_3$ wurde durch die äquivalente Menge an $\text{NH}_4\text{Cl}$ ersetzt.
2	Erhöhung der Konzentration der Phosphat-, Nitrat-, Spurenelement- und Vitamin-Stocklösung um das 25-, 50- und 100-fache.
3	Es wurde die 25-fache Konzentration der Phosphat-, Nitrat- und Vitamin-Stocklösung verwendet mit einer 5-, 10- und 20-fachen Konzentration der Spurenelement-Stocklösung.
4	Es wurde die 25-fache Konzentration der Phosphat-, Nitrat- und Spurenelement-Stocklösung verwendet mit einer 1- und 50-fachen Konzentration der Vitamin-Stocklösung.
5	Es wurde die 25-fache Konzentration der Phosphat-, Nitrat- und Spurenelement-Stocklösung verwendet mit einer 50-fachen Konzentration der Vitamin-Stocklösung mit einer 5- und 25-fachen Konzentration der Eisen-Stocklösung.
6	Es wurde die 25-fache Konzentration der Phosphat-, Nitrat- und Spurenelement-Stocklösung verwendet mit einer 50-fachen Konzentration der Vitamin-Stocklösung mit einer 2,5- und 12,5-fachen Konzentration der Silikat-Stocklösung.
7	Die Salzlösungen wurden um das 2- und 4-fache erhöht. Anschließend wurden die 25-fache Konzentrationen der Nitrat-, Phosphat-, Spurenelement-Stocklösung, die 12,5-fache Konzentration der Silikat-Stocklösung sowie die 50-fache Konzentration der Vitamin-Stocklösung zugegeben.

Es werden täglich die Zell- sowie Coccolithen-Konzentration bestimmt. Zudem wird am Ende des Versuches der Verbrauch an Nitrat, Phosphat und Calcium untersucht.

### 3.4 Kultivierungen in Photobioreaktoren

In diesem Kapitel werden die Kultivierungen von *E. huxleyi* in vier verschiedenen Reaktorsystemen beschrieben. Alle Kultivierungen werden mit dem Stamm CCMP3266 durchgeführt. In Tabelle 3.4 sind die Prozessparameter zusammengefasst, die in allen Kultivierungen angewendet werden. Die Regelung aller Kultivierungsprozesse sowie das Aufzeichnen der Messdaten erfolgt durch BioProCon. Dabei handelt es sich um ein LabVIEW-basiertes Programm, das institutsintern entwickelt wurde.

Tabelle 3.4: Zusammenfassung der Prozessparameter für die Kultivierungsversuche von *Emiliania huxleyi*

<b>Prozessparameter</b>	<b>Einstellung</b>
Temperatur [°C]	19
pH-Wert [-]	8
Begasungsrate [vvm]	0,05
CO <sub>2</sub> -Anteil an der Luftbegasung [%]	1
Photonenflussdichte [ $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ]	350

### 3.4.1 Rührkesselreaktor

Für die Rührkesselreaktorversuche wurde das Modell KLF 2000 der Firma BioEngineering mit einem Arbeitsvolumen von 2 L verwendet. Um den transparenten Glaszylinder des Reaktors ist ein LED-Lichtmantel installiert. Die verwendeten warmweißen LEDs besitzen ein breites Spektrum im PAR-Bereich. Dieser kann phasenweise angesteuert werden, wodurch beliebige Hell-Dunkel-Zyklen simuliert werden können. Ein weiterer Vorteil dieses Mantels ist, dass das Licht in Richtung Reaktormitte fokussiert wird, wodurch eine gegenseitige Abschattung der Zellen verhindert wird [91]. Die Kalibrierung des Lichtmantels erfolgt mit Hilfe eines planaren Lichtsensors im Reaktorinneren. Im Abstand von 7,5 cm und 15 cm zum Reaktorboden sind Rushton-Rührer auf einer Rührwelle angebracht, die mit einer Drehzahl von 150 rpm betrieben sind. An dem Deckel des Reaktors sind die pH- und  $p_{O_2}$ -Sonden angebracht, sowie das Überdruckventil, die Anschlüsse für die Stellmittel (1 M NaOH, 0,25 M HCl, pH-Regelung durch Titration) und der Feed. Auch die Anschlüsse für die Zuluftstrecke mit Zuluft-Befeuchtung und Abluftstrecke mit nachgeschalteter Abgasanalytik befinden sich am Deckel. Das Luft/ $CO_2$ -Gemisch wird mit Massendurchflussmessern geregelt. Diese werden vor jeder Kultivierung mit Hilfe eines Seifenblasen-Durchflussmessers kalibriert. Alle Kultivierungen werden mit einem Volumen von 1,6 L durchgeführt und mit einer Oberflächenbegasung begast. Am Reaktorboden befinden sich die Probenahmevorrichtung, der Temperaturfühler sowie der Heiz- und Kühlstab. Die Probenahme erfolgt durch Öffnen eines Ventiles, wodurch die Kulturbrühe in ein steriles Glasgefäß läuft. Das Inokulum beträgt etwa 10 % des Reaktorvolumens und wird über den Feed-Anschluss am Reaktordeckel zugegeben. Innerhalb des Reaktors sind zusätzlich vier Stromstörer verbaut. Das Oberflächen-zu-Volumenverhältnis beträgt  $45,18 \text{ m}^{-1}$ .

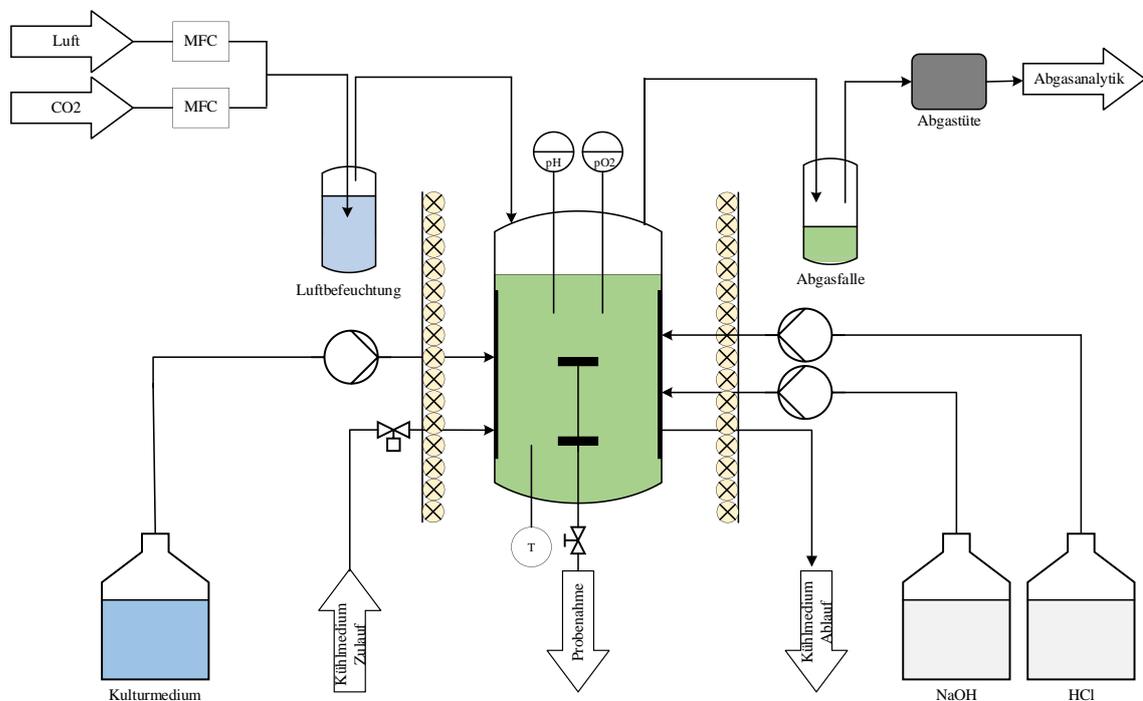


Abbildung 3.1: Fließbild der Anlage mit dem Rührkesselreaktor

Die Kultivierungen im Rührkesselreaktor verliefen steril. Dafür wurden alle Flaschen der Peripherie separat autoklaviert. Für die Sterilisation des Reaktors wurde dieser mit destilliertem Wasser befüllt und für 20 min auf 121 °C aufgeheizt. Der Reaktor wurde anschließend mit Medium befüllt und vor dem Animpfen für 48 h equilibriert.

#### 3.4.1.1 Hell-Dunkel-Zyklen

Der Reaktor wird mit einer Startkonzentration von  $2,5 \cdot 10^5$  Zellen·ml<sup>-1</sup> angeimpft. Als Lichtbedingungen werden ein 15:9-Hell-Dunkel-Zyklus sowie eine permanente Beleuchtung eingesetzt. Als Medium wird die Optimierung von Jakob et al. genutzt [94]. Die Rührerdrehzahl liegt bei 150 rpm. Zum Ende der Dunkelphase sowie in der Mitte der Tag-Phase werden 75 ml Probe aus dem Reaktor für weitere Analysen entnommen. Der Reaktor wird anschließend wieder auf das Ausgangsvolumen mit frischem Medium aufgefüllt. Auch die Versuchsreihe mit der permanenten Beleuchtung werden zu denselben Zeiten beprobt.

#### 3.4.1.2 Optimierungsversuch

Im Rührkessel wurden zwei Kultivierungen durchgeführt, um das Wachstum und die Kalzifizierung von *E. huxleyi* zu verbessern. Die verwendeten Medien sind im Anhang unter Kapitel 7.2.2 zu finden. Die Kultur wird mit 10 % des Reaktorvolumens angeimpft. In der ersten Kultivierung wird eine Rührerdrehzahl von 150 rpm verwendet. Zudem sind vier Stromstörer eingebaut. In der zweiten Kultivierung werden die Stromstörer entfernt und die Rührerdrehzahl auf 100 rpm erniedrigt.

#### 3.4.2 Bag-Reaktor

Der Reaktor besteht aus einem modifizierten 20 L STD Flexboy (Sartopore/OPTA) von Sartorius. Dieser wird auf der Oberseite mit Anschlüssen für eine pH- und pO<sub>2</sub>-Sonde versehen. Die pH-Sonde dient dabei ebenfalls als Temperatursensor, zur Regulierung der Kühlung des Reaktors. Der Reaktor befindet sich in einer Wanne mit eingebauter Kühlplatte, die von einem Kühlaggregat gespeist wird. Die Wanne selbst wird durch einen Rotationsschüttler bei 50 rpm langsam bewegt, um innerhalb des Reaktors eine wellenartige Bewegung zu erzeugen. Dabei kann ein Reaktorvolumen von 15 L erreicht werden. Bei Überschreitung dieses Füllstandes wird das Medium durch den Abgasauslass oben auf dem Reaktor ausgetrieben. Daher wird am Auslass eine Auffangflasche angebracht, um das Einbringen von Flüssigkeit in den Abgasanalysator zu vermeiden. Da der Flexboy bereits vom Hersteller mit drei Anschlüssen versehen ist, werden diese für den Feed, die Probenahme und die Zuluft verwendet. Die Zuluft besteht aus einem befeuchteten Luft-CO<sub>2</sub>-Gemisch, die von zwei steuerbaren Massen-Durchflussreglern kontrolliert wird. Diese werden vor jeder Kultivierung mit einem Seifenblasen-Durchflussmesser kalibriert. Die Probenahme erfolgt mit einer sterilen Luer-Lock Spritze. Dieses System wird ebenfalls zum Animpfen des Reaktors verwendet, indem etwa 10 % des Reaktorvolumens an Algensuspension zugegeben wird. Die Stellmittelzugabe (1 M NaOH und 0,25 M HCl) wird über die Änderung des pH-Wertes durch Titration mit zwei Pumpen geregelt. Die Schläuche enden in Kanülen, die durch ein Septum gestochen und fixiert werden. Dieser Anschluss ist auf der Oberseite des Reaktors. Über dem Reaktor befindet sich ein großes LED-Panel. Dieses wird mit einem planaren Lichtsensor auf der Oberfläche des Reaktors auf die gewünschte PFD eingestellt. Das Oberflächen-zu-Volumenverhältnis beträgt 22,2 m<sup>-1</sup>.

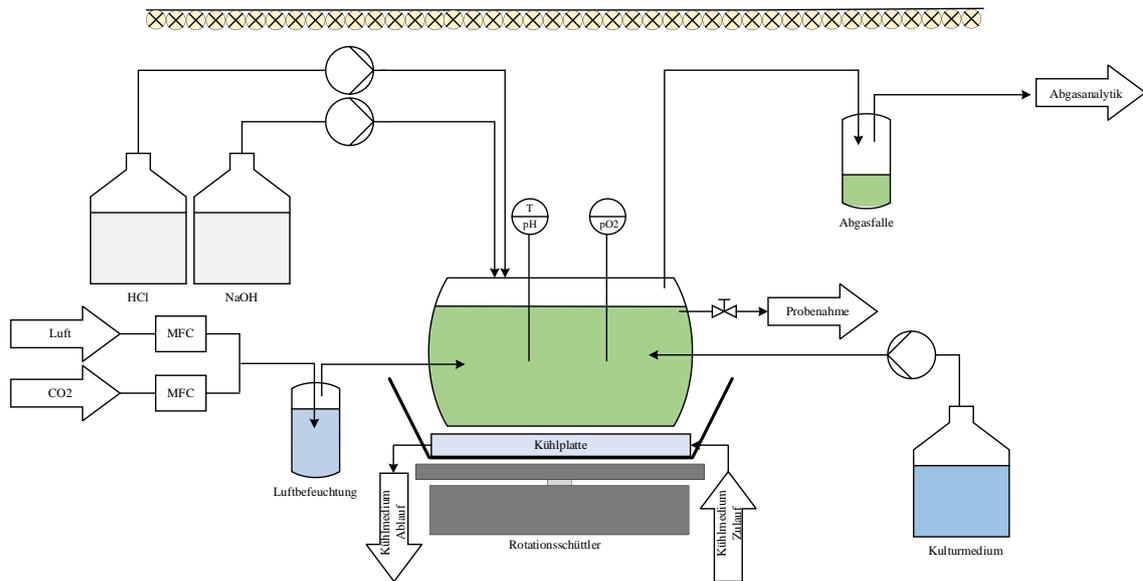


Abbildung 3.2: Fließbild der Anlage mit dem Bag-Reaktor

Obwohl es sich bei den Kultivierungen im Bag-Reaktor um unsterile Kultivierungen handelt, wurden alle verwendeten Lösungen vor dem Einsatz autoklaviert. Zudem wurde vor Beginn der Kultivierung für eine halbe Stunde ein pH-Shift auf pH 12 in Wasser durchgeführt, um möglichen Kontaminationen vorzubeugen.

#### 3.4.2.1 Optimierungsversuch

Der Reaktor wird mit 10 % des Reaktorvolumens inokuliert. Die verwendeten Medien sind im Anhang unter Kapitel 7.2.2 zu finden.

#### 3.4.2.2 Semi-kontinuierlicher Betrieb

Der Reaktor wird mit 14 L Medium befüllt und mit 10 % des Reaktorvolumen inokuliert. Als Medium wird die finale Optimierung aus Kapitel 3.3.3 verwendet. Die detaillierte Zusammensetzung ist im Anhang unter Kapitel 7.2.2 zu finden. Die Probenahmen zur Ermittlung der Zellzahl, Coccolithen-Konzentration- und Masse sowie die Untersuchung des Phosphatverbrauches finden zwei Mal pro Woche statt. Ein Mediumswechsel findet statt, sobald die Phosphatkonzentrationen unter eine Grenze von 10 % der Ausgangskonzentration gefallen sind. Dabei werden bis zu 6 L Kulturbrühe aus dem Reaktor entfernt und durch die äquivalente Menge an frischem Medium ersetzt. Dafür wird 4-fach Konzentriertes ESAW-Medium verwendet. Dies ist im Anhang unter Kapitel 7.2.2 zusammengefasst.

#### 3.4.3 Membranreaktor

Der verwendete Membranreaktor wird von der Firma CellDeg (HDC 1.1500, Model T, Deutschland) erworben. Dieser besitzt eine zylindrische Form und ein Kultivierungsvolumen von 2 L. Der Deckel des Reaktors besteht aus Plexiglas und wird mit den Anschlüssen für die Stellmittel (1 M NaOH, 0,25 M HCl, Regelung durch Titration mit Pumpen), der pH-Sonde, die gleichzeitig

auch die Temperatur misst, dem Feed und der Probenahme bestückt. Die Probenahme erfolgt mit einer sterilen Spritze mit Luer-Lock Anschluss. Über den Probenahmeanschluss wird der Reaktor zudem mit etwa 10 % des Reaktorvolumens mit Algensuspension inokuliert. Innerhalb des Reaktors ist vom Hersteller eine Kühlschlange verbaut, welche an das Kühlwassersystem angeschlossen wird. Am Reaktorboden befindet sich die Membran. Diese transportiert das eingetragene Gas, insbesondere das CO<sub>2</sub>, blasenfrei per Diffusion in die Mikroalgen-Suspension. Unterhalb der Membran wird die Zuluft des Reaktors angeschlossen. Dabei wird ein Luft/CO<sub>2</sub>-Gemisch verwendet, das von einem Massen-Durchflussmesser geregelt wird. Dieser wird vor jeder Kultivierung mit einem Seifenblasen-Durchflussmesser kalibriert. Um einen Flüssigkeitsverlust zu vermeiden, wird die Zuluft an eine Zuluftbefeuchtung gekoppelt. Es wird mit einem Kultivierungsvolumen von 1,8 L gearbeitet. Oberhalb des Reaktors ist ein LED-Panel angeschlossen. Dieses wird mit einem planaren Lichtsensor am Deckel des Reaktors kalibriert. Die Durchmischung des Reaktors erfolgt mit Hilfe eines Kreisschüttlers. Das Oberflächen-zu-Volumenverhältnis beträgt 166,6 m<sup>-1</sup>.

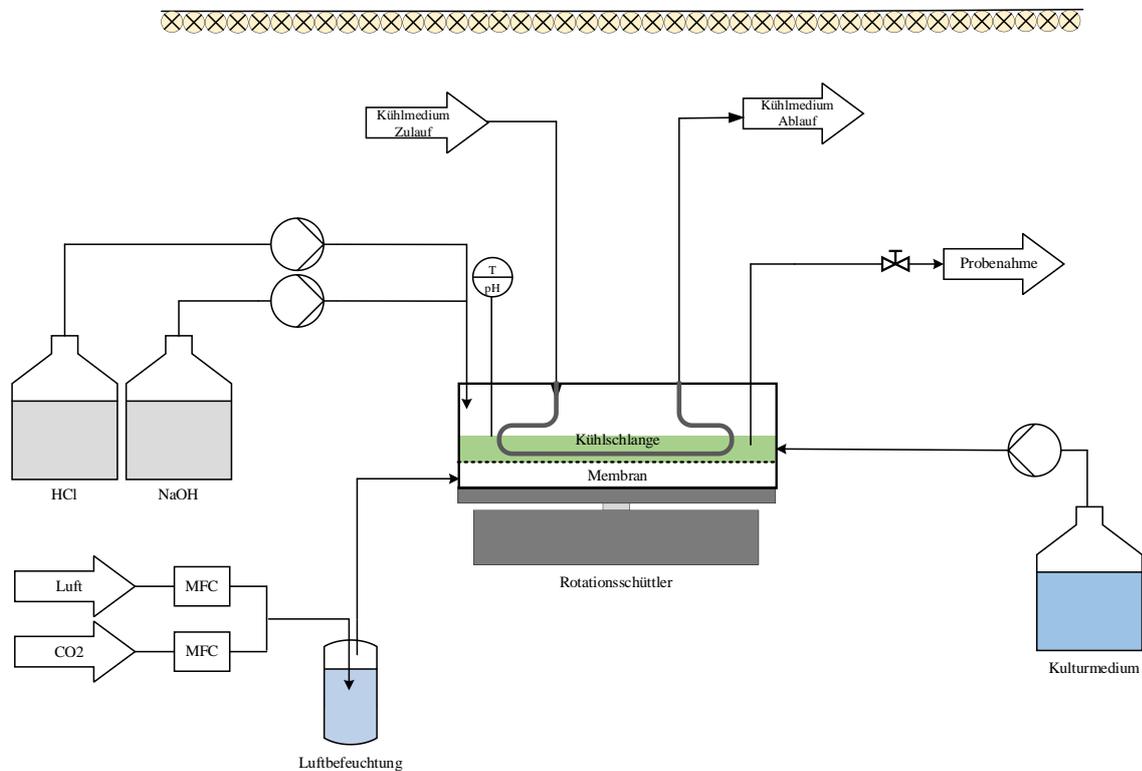


Abbildung 3.3: Fließbild der Anlage mit dem Membranreaktor. (Quelle: Anastassia Trikin, modifiziert)

Bei Erhalt des Reaktors war dieser bereits chemisch sterilisiert. Nach Beendigung jeder weiteren Kultivierung, wird eine Sterilisation mit Wasserstoffperoxid durchgeführt.

### 3.4.3.1 Optimierungsversuch

Der Reaktor wird mit 10 % des Reaktorvolumens angeimpft. Während der ersten Kultivierung wird eine Schüttelfrequenz von 50 rpm verwendet. Die verwendeten Medien sind im Anhang

unter Kapitel 7.2.2 zu finden. In der zweiten Kultivierung wird die Schüttelfrequenz um 50 % auf 75 rpm erhöht. Zudem wird ein Sterilfilter an die Zuluftstrecke angebracht.

#### 3.4.3.2 Semi-kontinuierlicher Betrieb

Für den semi-kontinuierlichen Betrieb wird der Membranreaktor mit 980 ml der Kultursuspension aus dem Bag-Reaktor-Versuch (siehe Kapitel 3.4.2.2) angeimpft. Das restliche Reaktorvolumen wird mit 1 L des 2-fach konzentrierten ESAW aufgefüllt. Die detaillierte Zusammensetzung ist im Anhang unter Kapitel 7.2.2 zu finden. Die Probenahme wird zwei Mal pro Woche durchgeführt. In regelmäßigen Abständen werden 900 ml aus dem Reaktor geerntet und mit der äquivalenten Menge an 4-fach konzentriertem ESAW-Medium aufgefüllt. Die Zusammensetzung ist im Anhang unter Kapitel 7.2.2 zusammengefasst. Während dieser Versuchsreihe wird zudem die Photonenflussdichte von  $153 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  auf  $1330 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  erhöht.

#### 3.4.4 Schlauchreaktor

Der Schlauchreaktor wird von der Firma Phytolutions GmbH speziell für Mikroalgen entwickelt und direkt dort erworben [180]. Für die Kultivierungen werden vier Säulen verwendet, was einem Kultivierungsvolumen von 14 L entspricht. Die Kunststoffolie wird auf einem Metallgerüst aufgehängt. Die Begasung erfolgt über Blasenbegasung durch einen Schlauch, der sich horizontal zum Reaktorboden befindet. Das  $\text{CO}_2$ /Luft-Gemisch wird mit Hilfe von Massen-Durchflussmessern kontrolliert, die vor jeder Kultivierung mit einem Seifenblasen-Durchflussmesser kalibriert wurden. In die Kunststoffolie werden Anschlüsse für die pH-Sonde, die gleichzeitig auch die Temperatur misst, die pH-Stellmittel (1 M NaOH, 0,25 M HCl, Regelung über Titration mit Pumpen), die Probenahme und den Feed verbaut. Die Probenahme erfolgt mit sterilen Spritzen mit Luer-Lock Anschluss. Über den Probenahmeanschluss werden etwa 10 % des Reaktorvolumens an Algensuspension als Inokulum zugegeben. An dem Metallgerüst oberhalb des Reaktors ist ein perforiertes Kunststoffrohr angebracht. Aus diesem läuft das Kühlwasser über die Reaktorsäulen. Das Kühlwasser wird dann in einem Sammelbecken aufgefangen und konnte mit Hilfe einer Pumpe dem Kühlsystem erneut zugeführt werden. Orthogonal zum Reaktor ist ein LED-Panel angebracht. Dieses wird mit einem planaren Lichtsensor auf die gewünschte PFD kalibriert. Das Oberflächen-zu-Volumenverhältnis beträgt  $66,3 \text{ m}^{-1}$ .

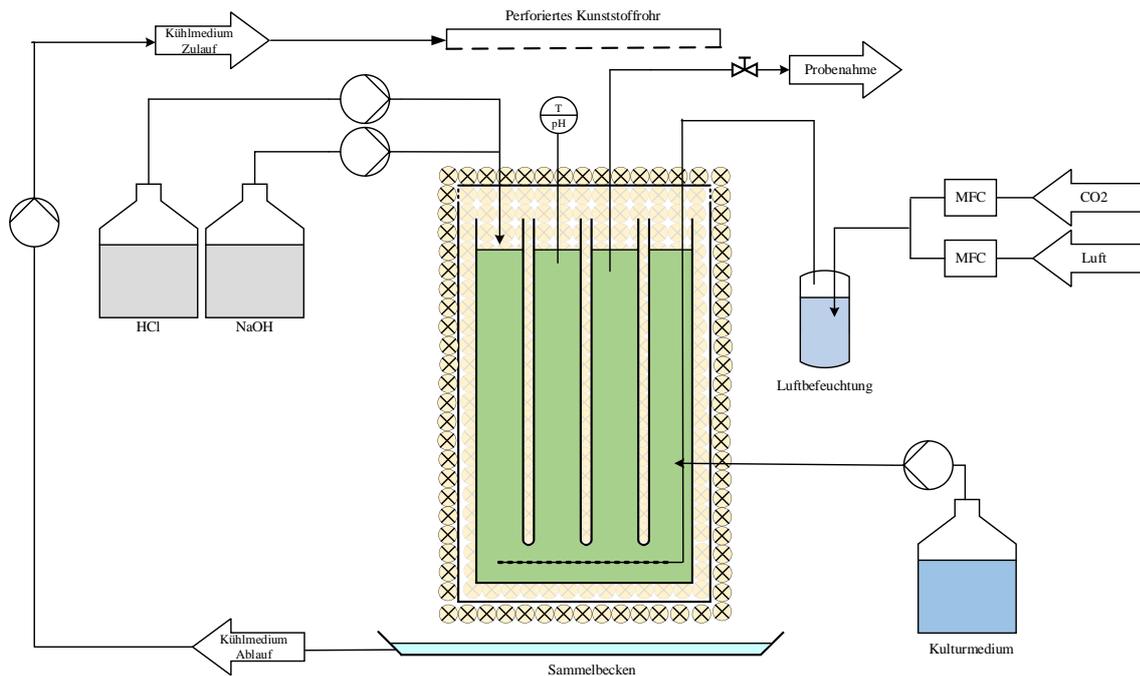


Abbildung 3.4: Fließbild der Anlage mit dem Schlauchreaktor (Quelle: Anastassia Trikin, modifiziert)

Bei diesem Reaktorsystem handelt es sich um ein offenes System, da er an den Aufhängeschlaufen nicht dicht abschließt. Vor der Kultivierung wird der Reaktor mit destilliertem Wasser befüllt und der pH-Wert auf 12 erhöht, um bestehende Kontaminationen weitestgehend abzutöten. Die Flaschen der Peripherie sowie das Medium werden separat autoklaviert.

### 3.4.4.1 Optimierungsversuch

Der Reaktor wird mit 10 % des Reaktorvolumens inokuliert. Die detaillierte Zusammensetzung des verwendeten ESAW-Mediums ist im Anhang unter Kapitel 7.2.2 zu finden. In der ersten Kultivierung wird der mitgelieferte poröse Begasungsschlauch verwendet, der horizontal im unteren Teil des Reaktors eingebaut wird. In dem zweiten Versuch wird stattdessen ein Silikonschlauch mit Löchern verwendet, um Blasen mit einem größeren Durchmesser zu erzeugen.

## 3.5 Analytik

### 3.5.1 Mikroskopie

Die Bestimmung der Vitalität, Aussehen, Zellgröße, Zellzahl und Coccolithen-Konzentration erfolgt mit Hilfe des Mikroskops. Zur Vermessung der Zellen wird das Programm Microscope VIS verwendet. Dieses erlaubt mit Hilfe der eingebauten Kamera am Mikroskop Fotos und Videos mit passendem Maßstab anzufertigen sowie Längenangaben zu ermitteln.

### 3.5.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahlbestimmung erfolgt mit Hilfe der Thoma-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop. Die Zählkammern bestehen jeweils aus 16 Kleinquadraten mit einer Fläche von  $0,0025 \text{ mm}^2$ , die zusammen ein Großquadrat bilden. Aufgrund der erhöhten Glasstege links und rechts der Kammer, wird durch das Auflegen eines Deckglases, eine Kammertiefe von  $0,1 \text{ mm}$  erzeugt. In die Kammer wird etwa  $10 \mu\text{l}$  gemischte Algensuspension gegeben. Anschließend werden die Zellen innerhalb des Großquadrates mit 400-facher Vergrößerung gezählt. Mit Hilfe der Formel 3.1. konnte dann die Zellzahl pro Milliliter berechnet werden. Die Bestimmung erfolgt in Dreifachbestimmung.

$$c_{\text{Zellen}} [\text{Zellen} \cdot \text{ml}^{-1}] = \frac{\text{Zellzahl pro Großquadrat}}{16 \cdot 0,0025 \text{ mm}^2 \cdot 0,1 \text{ mm}} \cdot 1000 \frac{\text{mm}^3}{\text{ml}} \cdot V \quad (3.1)$$

$c_{\text{Zellen}}$  : Zell-Konzentration [ $\text{Zellen} \cdot \text{ml}^{-1}$ ]

$V$  : Verdünnungsfaktor [-]

### 3.5.3 Bestimmung der Coccolithen-Konzentration

Für die Coccolithenaufreinigung werden  $1,5 \text{ ml}$  Probe in ein Safelock-Eppendorfgefäß gefüllt. Die Proben werden dann für mindestens  $48 \text{ h}$  bei  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  im Trockenschrank gelagert. Dadurch werden die Zellen aufgeschlossen, wodurch ein Ablösen der Coccolithen stattfindet. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Proben kurz durchmischt und anschließend für  $10 \text{ min}$  bei  $11000 \text{ rpm}$  bei  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Anschließend wird die Probe gewaschen. Dafür wird  $1 \text{ ml}$  des Überstandes entfernt und mit  $1 \text{ ml}$   $0,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$ -Lösung ersetzt. Das entstehende Pellet wird durch vortexen re-suspendiert. Danach wird erneut für  $10 \text{ min}$  zentrifugiert, dieses Mal bei  $3000 \text{ rpm}$  und bei  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Dieser Vorgang wird wiederholt, bis die Zelltrümmer aus der Probe herausverdünnt wurden. Dafür wird die Probe regelmäßig nach den Waschgängen bei einer 400-fachen Vergrößerung mikroskopiert. Die Bestimmung der Coccolithen-Konzentration kann mit Hilfe der Thoma-Kammer und Formel 3.1. berechnet werden. Die Bestimmung erfolgt in Dreifachbestimmung.

### 3.5.4 Bestimmung der Coccolithenmasse

Für die Bestimmung der Coccolithenmasse werden  $1,5 \text{ ml}$  Eppendorfgefäße leer gewogen. Anschließend werden  $1,5 \text{ ml}$  der aufgereinigten Coccolithen (siehe Kapitel 3.5.3) in das Gefäß überführt und für  $48 \text{ h}$  mit geöffnetem Deckel getrocknet. Gleichzeitig werden ebenfalls in vorgewogenen Eppendorfgefäßen  $1,5 \text{ ml}$  der  $0,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$ -Lösung getrocknet. Nach dem Trocknungsprozess kann anschließend das Coccolithengewicht der Probe mit einer Analysewaage bestimmt werden.

### 3.5.5 Bestimmung der Nährstoffverbrauchs

Aufgrund der komplexen Zusammensetzung des ESAW-Mediums musste vor der Verwendung der folgenden Assays überprüft werden, ob diese aufgrund der vorhandenen Fremdstoffe anwendbar sind. Der Nitrat- und Phosphat-Assay können beispielsweise durch zu hohe Konzentrationen an NaCl (ab 5 %) und an Magnesium (ab  $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) gestört werden. Dies erfordert ein geeignetes Verdünnen der Proben bevor die Vermessung beginnen kann.

#### 3.5.5.1 Nitrat-Assay

Der verwendete Nitrat-Assay ermöglicht eine Nitratmessung in Seewasser von  $0,9\text{-}75,3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Der Test basiert auf der Reaktion von Nitrat- und Chlorid-Ionen, wodurch Indophenol (orangerot) gebildet wird. Dies kann bei  $500 \text{ nm}$  photometrisch gemessen werden.

Für die Bestimmung der Nitratkonzentration wird eine Kalibriergerade benötigt. Dafür werden geeignete Konzentrationen mit einer Nitrat-Standardlösung und Reinstwasser angesetzt.  $5 \text{ ml}$  des Test-Reagenzes 1 (enthält Schwefelsäure) werden in verschließbare Reagenzröhrchen gegeben. Anschließend wird  $1 \text{ ml}$  steril filtrierte Probe ( $\emptyset = 0,45 \mu\text{m}$ ) zugegeben. Unmittelbar danach werden  $1,5 \text{ ml}$  des Reagenz 2 (Resorcinlösung) zugegeben und gevortext. Das Gemisch wird dann für  $15 \text{ min}$  bei Raumtemperatur inkubiert, bevor zwei Mikrolöffel des Reagenz 3 (Chloridhaltiges Salz) gelöst werden können. Es erfolgt eine weitere Inkubation von sechzigminütiger Dauer. Die Proben können dann in eine Polystyrolküvette überführt werden und bei  $500 \text{ nm}$  im Photometer vermessen werden. Die Bestimmung erfolgt als Einfachbestimmung.

#### 3.5.5.2 Phosphat-Assay

Der verwendete Phosphat-Assay kann Orthophosphat-Konzentrationen in einem Bereich von  $0,03\text{-}15,3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  messen. Dabei reagieren Orthophosphationen in schwefelsaurer Lösung mit Molybdationen zu Molybdato-phosphorsäure. Durch die anschließende Reduktion zu Phosphormolybdänblau mit Ascorbinsäure ist eine photometrische Quantifizierung bei  $880 \text{ nm}$  möglich.

Für die Bestimmung der Phosphatkonzentration ist eine Kalibriergerade erforderlich. Dafür wird eine  $0,145 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ -Lösung angesetzt, was etwa einer Phosphatkonzentration von  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  entspricht. Mit Reinstwasser werden dann geeignete Konzentrationen für die Kalibrierung angesetzt. Anschließend werden  $5 \text{ ml}$  der steril filtrierten Probe in ein verschließbares Reagenzglas gegeben. Daraufhin werden  $5$  Tropfen des Reagenz 1 (Schwefelsäure) des Test-Kits zugegeben und vermischt. Danach wird ein gestrichener Mikrolöffel des Reagenz 2 (Ascorbinsäure) in das Gemisch gegeben und so lange gevortext, bis keine Rückstände mehr zu sehen sind. Nach fünfminütiger Inkubation wird die Probe in einer Polystyrolküvette überführt und bei  $880 \text{ nm}$  im Photometer vermessen. Die Bestimmung erfolgt als Einfachbestimmung.

#### 3.5.5.3 Calcium-Assay

Während dieser Arbeit wurden zwei Calcium-Tests verwendet. Zu Beginn wurde der photometrische Test von Merk verwendet. Dieser kann Calciumkonzentrationen in einem Messbereich von  $5$  bis  $160 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  nachweisen. Bei dieser Nachweismethode komplexieren die in der Probelösung

enthaltenen Calciumionen durch modifiziertes Glyoxal-bis(2-hydroxyanil) in alkoholisch-alkalischer Lösung. Dadurch entsteht ein rotvioletter Komplex, der dann bei einer Wellenlänge von 544 nm vermessen werden kann.

Für die Bestimmung der Calciumkonzentration war eine Kalibriergerade notwendig. Zu Beginn wurde diese mit einer Calciumstandardlösung für die Ionenchromatographie angesetzt. Diese basierte auf Calciumnitrat. Da die Standardabweichungen jedoch inakzeptabel waren, wurde eine Kalibrierlösung auf Basis von Calciumchlorid-dihydrat angesetzt, da dies die Calciumquelle des ESAW-Mediums ist. Damit konnten zufriedenstellende Ergebnisse erzielt werden.

Für die Durchführung wurden 0,1 ml Probe in ein Reagenzglas gegeben. Danach wurden 5 ml des Kit-Reagenz 1 (Diethylenglycol) zugegeben. Anschließend wurden 4 Tropfen des Reagenz 2 (Natriumhydroxid) und vier Tropfen des Reagenz 3 (N,N-Dimethylformamid) hinzugefügt. Nach jedem Schritt wurde die Probe sehr gut durchmischt. Nach der Zugabe von Reagenz 3 wurde das Gemisch für exakt 8 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die Probe zügig in einer Polystyrol Makroküvette überführt und bei 544 nm vermessen.

Da der photometrische Test zu enormen Abweichungen führte, wurde der Calciumtest im Verlauf der Arbeit ausgetauscht. Es wurde dann ein Titrationstest für die Bestimmung des Calciumgehaltes in Meerwasseraquarien verwendet. Dafür werden 2 ml des filtrierten Kulturüberstandes in das mitgelieferte Plastikgefäß pipettiert. Anschließend wird ein gestrichener Löffel des Ca-1-Salzes zu gegeben. Die mitgelieferte Spritze wird bis zur 1 ml Marke mit dem Ca-2-Reagenz aufgezogen. Dann werden 0,6 ml des Reagenzes in die Probe gegeben und 5 Sekunden geschwenkt. Von nun an wird tropfenweise das Reagenz in das Testgefäß pipettiert. Das Gemisch wird nach jeder Zugabe für etwa 2 Sekunden geschwenkt. Dieser Vorgang wird solange wiederholt, bis ein Farbumschlag von rosa zu blau erfolgt. Durch das Umdrehen der Spritze und ablesen der Skala kann der Calciumwert mit Hilfe der mitgelieferten Tabelle abgelesen werden. So kann ein Calciumgehalt zwischen  $10,23\text{-}511,5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  bestimmt werden. Die Bestimmung erfolgt als Einfachbestimmung.

### 3.5.6 Bestimmung der Makromischzeit

Für die Bestimmung der Makromischzeiten der Reaktoren wird eine Farblösung mit Lebensmittelfarbe und Wasser hergestellt. Etwa 0,33 % des Reaktorvolumens werden dann über den Feed- oder Probenahmeanschluss stoßartig in den Reaktor gegeben. Das Restliche Füllvolumen des Reaktors besteht aus destilliertem Wasser mit der Menge NaCl, wie es auch im ESAW-Medium vorliegt, um die Salinität des Mediums zu simulieren. Der gesamte Vorgang wird gefilmt. Der Zeitraum von der Zugabe bis zur vollständigen Durchmischung wird als Makromischzeit definiert.

## 3.6 Berechnungen

### 3.6.1 Berechnungen des Wachstums und der Kalzifizierung

Da in allen Versuchen der Verlauf der Zell-Konzentration über die Prozesszeit aufgenommen wird, kann mit Hilfe der Gleichung 3.2 die Anzahl der Teilungszyklen einer Kultur bestimmt werden.

$$n_{Td} [-] = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2} \quad (3.2)$$

$n_{Td}$  : Anzahl der Teilungen  
 $N$  : Zellzahl nach  $n$  Teilungen  
 $N_0$  : Startzellzahl

Die Coccolithenmasse wird durch die Gewichts-differenz von leeren und gefüllten Eppendorfgefäßen bestimmt. In den gefüllten Gefäßen befinden sich die aufgereinigten und anschließend getrockneten Coccolithen. Das ausführliche Protokoll ist in Kapitel 3.5.4 beschrieben. Die volumetrische Coccolithen-Produktivität kann anschließend mit Hilfe der Gleichung 3.3 ermittelt werden.

$$R_{P,V} [g \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}] = \frac{m_{Coccolithen2} - m_{Coccolithen1}}{(t_1 - t_2)} \quad (3.3)$$

$R_{P,V}$  : Volumetrische Coccolithen-Produktivität  
 $m_{Coccolithen}$  : Coccolithenmasse  
 $t$  : Zeitpunkt

In den Schüttelkolbenversuchen oder auch in den Reaktorversuchen, in denen die Coccolithenmassen unter der Nachweisgrenze liegt, konnte keine volumetrische Coccolithen-Produktivität bestimmt werden. Da jedoch in allen Versuchen die Coccolithen-Konzentration gemessen wird, konnte stattdessen die zelluläre Coccolithen-Produktivität nach Gleichung 3.4 berechnet werden.

$$R_{P,C} [Coccolithen \cdot Zelle^{-1} \cdot d^{-1}] = \frac{c_{Coccolithen1} - c_{Coccolithen2}}{c_{Zellen} \cdot (t_1 - t_2)} \quad (3.4)$$

$R_{P,C}$  : Zelluläre Coccolithen-Produktivität  
 $c_{Coccolithen}$  : Coccolithen-Konzentration  
 $c_{Zellen}$  : Zell-Konzentration  
 $t$  : Zeitpunkt

Durch die Differenz der Nährstoff-Konzentrationen an Phosphat, Nitrat und Calcium kann nach Gleichung 3.5 die Substrataufnahmerate berechnet werden.

$$R_X [pg \cdot Zelle^{-1} \cdot d^{-1}] = \frac{c_{X1} - c_{X2}}{c_{Zellen} \cdot (t_1 - t_2)} \quad (3.5)$$

$R_X$  : Substrataufnahmerate  
 $c_X$  : Substratkonzentration  
 $c_{Zellen}$  : Zell-Konzentration  
 $t$  : Zeitpunkt

### 3.6.2 Berechnungen zur Charakterisierung der Reaktoren

Mit Hilfe der Gleichung 3.6 kann das Oberflächen-zu-Volumenverhältnis eines Reaktors berechnet werden.

$$\text{Oberflächen-zu-Volumenverhältnis [m}^{-1}\text{]} = \frac{A}{V} \quad (3.6)$$

A : Oberfläche des Reaktors, die vom Licht bestrahlt wird  
V : Reaktorvolumen

Zudem kann mit Gleichung 3.7 die spezifische Photonenaufnahmerate bestimmt werden. Dafür wird die Annahme getroffen, dass alle eingestrahlenen Photonen von den Zellen aufgenommen wurden.

$$r_{\text{Photonen, abs}} \left[ \frac{\mu\text{mol Photonen}}{\text{Zelle} \cdot \text{s}} \right] = \frac{I \cdot A}{V \cdot c_{\text{Zellen}}} \quad (3.7)$$

I : Lichtintensität  
A : Oberfläche des Reaktors, die vom Licht bestrahlt wird  
V : Reaktorvolumen  
 $c_{\text{Zellen}}$  : Zell-Konzentration

Mit Hilfe der Reynoldszahl können Fluidströmungen charakterisiert werden [48]. Diese Zahl kann angeben, ob die Strömung im Rührkesselreaktor laminar oder turbulent ist [182]. Bei laminarer Strömung liegt die Reynoldszahl unter  $10^2$  während sie bei turbulenten Strömungen bei über  $10^4$  liegt [182]. In einem Rührkesselreaktor mit Strömungsbrechern liegt die Reynoldszahl bei  $>10^4$  [179]. Mit Hilfe der Gleichung 3.8 kann die Reynoldszahl berechnet werden.

$$\text{Re [-]} = \frac{\rho \cdot n \cdot d^2}{\eta} \quad (3.8)$$

Re : Reynoldszahl  
 $\rho$  : Dichte des Mediums  
n : Rührerdrehzahl  
d : Rührerdurchmesser  
 $\eta$  : dynamische Viskosität des Mediums

Gleichung 3.9 dient zur Berechnung des volumetrischen Leistungseintrags.

$$\frac{P}{V_L} [\text{W} \cdot \text{m}^{-3}] = \frac{(\text{Ne} \cdot \rho \cdot n^3 \cdot d^5) \cdot N}{V_L} \quad (3.9)$$

P : Leistung [W]  
V : Volumen [m<sup>3</sup>]  
Ne : Newton-Zahl [-]  
 $\rho$  : Dichte [kg·m<sup>-3</sup>]  
 $n_R$  : Rührerdrehzahl [s<sup>-1</sup>]  
d : Rührerdurchmesser [m]  
 $N_R$  : Rührerdrehzahl [-]



# 4 Ergebnisse und Diskussion

## 4.1 Der Einfluss von Hell-Dunkel-Zyklen auf das Wachstum und die Kalzifizierung von *Emiliana huxleyi*

Der überwiegende Anteil an Kultivierungen von *Emiliana huxleyi* im Reaktor wurden bisher bei permanenten Licht durchgeführt [75, 94, 95]. Jedoch wird vermutet, dass sich der Einsatz von Hell-Dunkel-Phasen positiv auf das Wachstum mancher Algenspezies auswirkt. In den Versuchen von Brand und Guillard wurden 22 verschiedene marine Phytoplankton-Arten zum einen bei kontinuierlichem Licht, zum anderen bei einem 14:10 Hell-Dunkel-Zyklus kultiviert [22]. Dabei konnte beobachtet werden, dass ein erheblicher Anteil empfindlich auf kontinuierliches Licht reagierte [22]. Unter den getesteten Algen befand sich auch der *Emiliana huxleyi* Stamm A47 aus der Sargassosee, der unter kontinuierlichem Licht eine verringerte Teilungsrates zeigte [22]. Allerdings sind die Aussagen über das Wachstumsverhalten von *E. huxleyi* bei dem Einsatz von Hell-Dunkel-Zyklen widersprüchlich. So besaß kontinuierliches Licht auf den Stamm (Lohmann) Hay et Mohler 88E eine positive, auf den Stamm L eine negative und auf den Stamm B92/317 gar keine Wirkung auf das Wachstum [159, 168, 185, 244]. Eine Zusammenfassung der Versuche ist in Tabelle 4.1 dargestellt.

Tabelle 4.1: Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen während der Kultivierung unter Hell-Dunkel-Zyklen und permanenter Beleuchtung

Stamm	Dauer Hellphase [h]	Lichtintensität [ $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ]	$\mu$ [ $\text{d}^{-1}$ ]
B92/317 [159]	12	200	0,73
	18		0,75
	24		0,72
(Lohmann) Hay et Mohler 88E [185]	14	100	0,85
	24		1,13
Stamm L [244]	14	20	~ 0,6
	24		~ 0,44

Frühere Arbeiten am Institut erreichten bei kontinuierlichem Licht eine Zell-Konzentration von  $3,1 \cdot 10^7$  Zellen·ml<sup>-1</sup>. Dabei handelt es sich um die höchste erreichte *E. huxleyi*-Zellzahl, die bisher publiziert wurde [75]. Im Vergleich zu anderen Stämmen, ist diese jedoch noch immer sehr gering. Daher soll in diesem Versuch der Einfluss von Hell-Dunkel-Phasen auf das Wachstum und auf die Kalzifizierung von zwei kalzifizierenden *E. huxleyi* Stämmen sowie auf einen nicht-kalzifizierenden Stamm untersucht werden. Bei den kalzifizierenden Stämmen handelt es sich um den hoch-kalzifizierenden Stamm CCMP3266 und dem niedrig-kalzifizierenden Stamm CCMP371, die in Abbildung 4.1 dargestellt sind.

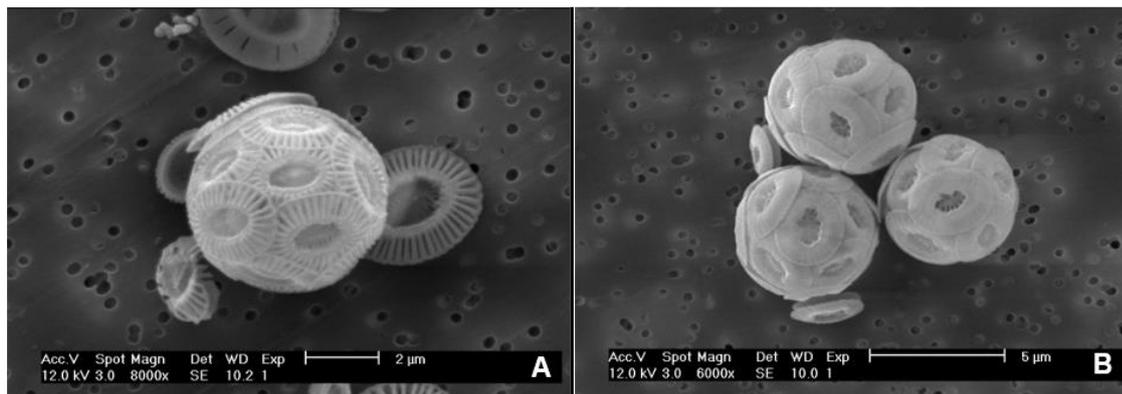


Abbildung 4.1: A: Der niedrig-kalzifizierende Stamm CCMP371, B: Der hoch-kalzifizierende Stamm CCMP3266 (Quelle: [76])

Um einen ersten Eindruck des Wachstumsverhaltens von *E. huxleyi* bei der Verwendung von Tag-Nacht-Zyklen zu erhalten, wurden Schüttelkolbenversuche (250 ml) durchgeführt. Da bekannt ist, dass sich das Wachstum von *E. huxleyi* mittels Tag-Nacht-Zyklen synchronisieren lässt, wurden die Kulturen vierzehn Tage vor dem Experiment mit den verwendeten Lichtbedingungen inkubiert [148]. Für die Auswahl der Zyklendauer wurde auf die geografische Herkunft des verwendeten *E. huxleyi* Stammes CCMP3266 zurückgegriffen. Dieser stammt aus der Tasmanischen See bei Neuseeland. Im September bis Februar 1992/93 konnte dort eine große *E. huxleyi*-Blüte beobachtet werden [192]. In diesen Monaten variiert die Tagphase zwischen 12 und 15 Stunden. Somit wurden für diese Versuchsreihe ein 15:9-Hell-Dunkel-Zyklus sowie ein 12:12-Hell-Dunkel-Zyklus gewählt. Aufgrund der Ergebnisse von Hariskos et al. wurde in der Hellphase eine Photonenflussdichte (PFD) von  $350 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  verwendet, da diese die optimale Lichtintensität für das Wachstum von *E. huxleyi* darstellt [76]. Neben den Zyklen wurden auch zwei Versuchsreihen mit einer permanenten Beleuchtung untersucht. Da eine Kultivierung mit einer PFD von  $350 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  in vorherigen institutsinternen Arbeiten sehr gute Ergebnisse geliefert hatte, wurde ein Kolben mit eben dieser Intensität als Vergleichskultur angesetzt [95]. Des Weiteren wurde eine Versuchsreihe mit einer PFD von  $220 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  untersucht. Dabei handelt es sich um die gemittelte Lichtintensität des 15:9-Zyklus. Hierdurch sollte überprüft werden, ob ein gegebenenfalls verbessertes Wachstum in den Zyklen lediglich durch eine Reduktion der PFD erfolgt. Nach erfolgreicher Durchführung der Vorversuche im Schüttelkolben soll, basierend auf den besten Ergebnissen, eine Kultivierung im Rührkesselreaktor durchgeführt werden.

#### 4.1.1 Schüttelkolbenversuche

Tabelle 4.2 gibt eine Übersicht der Ergebnisse der Hell-Dunkel-Zyklen im Schüttelkolben. Dort sind jeweils die höchsten erreichten Werte markiert. Bei den erreichten Zell-Konzentrationen kann die Entstehung nennenswerter Lichtgradienten ausgeschlossen werden. Die detaillierten Kurvenverläufe der Zell- und Coccolithenzahl sowie der Verbrauch an Phosphat, Nitrat und Calcium sind im Anhang unter Kapitel 7.3.1 zu finden. Da der nicht kalzifizierende Stamm RCC1217 im Vergleich zu den kalzifizierten Stämmen ein vermindertes Wachstum zeigte, wurde dieser nicht in der Diskussion berücksichtigt und ist im Anhang unter Kapitel 7.3.1 zu finden.

Tabelle 4.2: Zusammenfassung der Hell-Dunkel-Versuche in den Schüttelkolben

	Ansatz	Zellzahl [Zellen·ml <sup>-1</sup> ]	$\mu_{\text{gemittelt}}$ [d <sup>-1</sup> ]	Coccolithen- Konzentration [Coccolithen·ml <sup>-1</sup> ]	Gemittelte PFD [ $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ]	$\Gamma_{\text{Photonen, abs}}$ [ $\mu\text{mol Photon-}$ $\text{nen}\cdot\text{Zelle}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ]
CCMP3266	12:12	$1,3\cdot 10^8$	<b>0,9</b>	$3,9\cdot 10^8$	175	$3,9\cdot 10^{-6}$
	15:9	<b><math>2,0\cdot 10^8</math></b>	<b>0,9</b>	$4,2\cdot 10^8$	220	$3,2\cdot 10^{-6}$
	220	$1,4\cdot 10^8$	0,6	<b><math>6,1\cdot 10^8</math></b>	220	$4,6\cdot 10^{-6}$
	350	$1,2\cdot 10^8$	0,8	$3,5\cdot 10^8$	350	$8,8\cdot 10^{-6}$
CCMP371	12:12	<b><math>1,9\cdot 10^8</math></b>	0,6	$4,2\cdot 10^8$	175	$2,8\cdot 10^{-6}$
	15:9	$1,1\cdot 10^8$	0,7	$3,3\cdot 10^8$	220	$5,8\cdot 10^{-6}$
	220	$1,4\cdot 10^8$	0,7	<b><math>5,4\cdot 10^8</math></b>	220	$4,8\cdot 10^{-6}$
	350	<b><math>1,9\cdot 10^8</math></b>	<b>0,8</b>	$5,1\cdot 10^8$	350	$5,6\cdot 10^{-6}$

Wie in Tabelle 4.2 zu sehen ist, wird das Wachstum des hoch-kalzifizierenden Stammes CCMP3266 und auch des niedrig-kalzifizierenden Stammes CCMP371 durch den Einsatz von Hell-Dunkel-Zyklen positiv beeinflusst.

### Einfluss auf das Wachstum

Stamm CCMP3266 erreichte bei der Verwendung der Hell-Dunkel-Zyklen die höchste Wachstumsrate. Zudem erreicht die Kultur mit einem 15:9-Zyklus die höchste Zellzahl. Dieses verbesserte Wachstum resultiert einzig aus dem Wechsel zwischen Hell- und Dunkelphasen und nicht aus der Erniedrigung der PFD. Dies wird deutlich, indem die maximal erreichte Zell-Konzentration der Kultur mit einer permanenten Beleuchtung mit einer PFD von  $220\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  zum Vergleich herangezogen wird. In dieser Kultur ist die Zell-Konzentration deutlich niedriger, obwohl die gemittelte PFD des 15:9-Zykluses verwendet wird. In allen getesteten Lichtbedingungen findet innerhalb von 24 Stunden eine beziehungsweise auch zwei Zellteilungen statt. Diese Beobachtung wird in Kapitel 4.1.2 detaillierter beschrieben.

Stamm CCMP371 erreicht die höchste Zell-Konzentration ebenfalls bei der Verwendung eines Hell-Dunkel-Zyklus. Dabei handelte es sich jedoch um einen 12:12-Zyklus. Im direkten Vergleich zu Stamm CCMP3266 sind die erreichten Zell-Konzentrationen fast identisch, die gemittelte Wachstumsrate ist hingegen etwas geringer. Dies könnte an der Dauer der Hellphase liegen. Paasche hat durch Variationen der Hellphase der Hell-Dunkel-Zyklen beobachtet, dass eine längere Hellphase zu höheren Wachstumsraten führt [168].

Viele Phytoplanktonarten führen die Zellteilung bevorzugt in der Nacht durch [22, 168]. Mit Hilfe der Untersuchungen von Jochem und Meyerdierks [99] sowie Müller et al. [148] kann diese zeitliche Unterteilung genauer beschrieben werden. Diese Arbeitsgruppen konnten durch DNS-Fluoreszenz-Färbung von *E. huxleyi* den Anteil der Zellen in den verschiedenen Zyklusphasen bestimmen [99, 148]. Sie beobachteten, dass der Anteil an Zellen in der S-Phase, also der Phase in der die DNS-Replikation stattfindet (siehe Kapitel 2.3), deutlich zunahm, sobald die Dunkelphase begann [99, 148]. Gegen Ende der Dunkelphase nahm der Anteil an Zellen in der G<sub>2</sub>+M-Phase zu [99, 148]. Während der Hellphase waren die meisten Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase [99, 148]. In dieser Phase wächst die Zelle und führt ihre spezifischen Stoffwechselwege durch [181]. Anschließend folgt der Restriktionspunkt (in Abbildung 4.2 als „R“ bezeichnet). Bei Überschreiten dieses Punktes ist die Zelle zur Zellteilung verpflichtet [263]. So können die Zellen während der Hellphase

Energie durch die Photosynthese ansammeln, die dann in der darauffolgenden Dunkelphase durch die Zellatmung sowie zur DNS-Replikation und Zellteilung verbraucht wird [99]. Eine Übersicht gibt die folgende Abbildung 4.2.

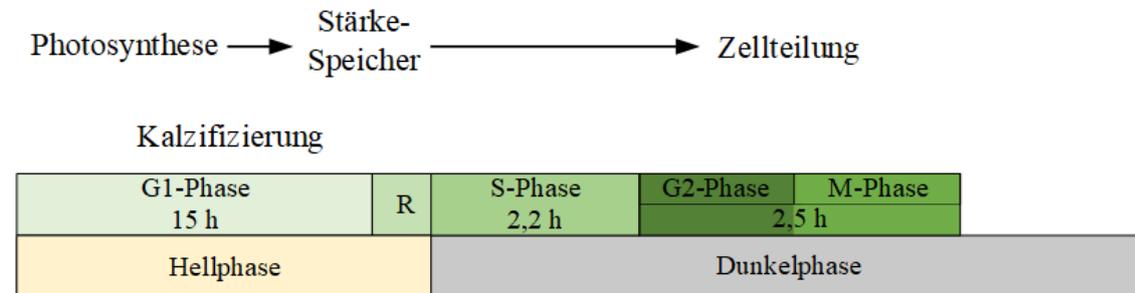


Abbildung 4.2: Übersicht der Anpassung des Zellzyklus an Hell-Dunkel-Zyklen. Dauer der S- und G<sub>2</sub>+M-Phase aus [148]

Da die Hellphase auf eine bestimmte Stundenzahl begrenzt ist, sind die Photonenmengen, die die Kulturen mit einem Hell-Dunkel-Zyklus erhalten, geringer. Die permanente Kultur mit einer PFD von  $350 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  erfährt eine Photonenmenge von  $1047 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  während es bei einem 15:9-Zyklus  $655 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  und bei einem 12:12-Zyklus  $524 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  sind. Da die Zellen, die mit einem Hell-Dunkel-Zyklus kultiviert wurden ihre Zellteilung in die Dunkelphase verlegen und dort keine Photosynthese durchführen können, besitzen sie keine direkte Energiezufuhr für die Proliferation. Somit müssen die Zellen bereits in der Hellphase Energiespeicher aufbauen, um einen oder gegebenenfalls auch zwei Replikationsvorgänge versorgen zu können. In *Chlorella spp.* dient Stärke als Kohlenstoffspeicher, welche in der Dunkelphase von den Zellen abgebaut werden [164, 227]. Die Akkumulation der Stärkespeicher hängt von der Lichtintensität ab. So konnte beobachtet werden, dass bei  $250 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  der Kohlenhydratanteil der Zellen höher war als bei  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  [164]. Interessanterweise wird die Dauer der G<sub>1</sub>-Phase phototropher Organismen ebenfalls von der Lichtintensität beeinflusst. Bei niedrigen Lichtintensitäten wird die Dauer der Phase verlängert, während bei hohen Lichtintensitäten ein gegenteiliger Effekt beobachtet werden konnte [146]. In der G<sub>1</sub>-Phase werden somit Strukturen wie Proteine, Membranlipide und die Bausteine für Nukleinsynthese synthetisiert, doch scheint der Aufbau von Energiespeichern zur Versorgung der Zellteilung ein weiterer Aspekt zu sein [126]. Anhand der erreichten Zell-Konzentrationen dieser Arbeit kann davon ausgegangen werden, dass sowohl 15 (CCMP3266) als auch 12 (CCMP371) Stunden Licht ausgereicht haben, um ausreichende Kohlenhydratspeicher für die Versorgung der Zellteilung in der Dunkelphase aufzubauen.

Diese zeitliche Anpassung des Wachstumszyklus mit der Mitose in der Dunkelphase könnte vorteilhaft für die Zelle sein. Ein wichtiger Punkt dabei ist, dass so die Photosynthese- und Mitoseereignisse, wie beispielsweise die Chloroplasten-Teilung, nicht parallel zueinander ablaufen [158]. Wie bei eigentlich allen Mikroalgen üblich und auch die Ergebnisse in Tabelle 4.2 zeigen, findet die Zellteilung auch bei kontinuierlichem Licht statt. Jedoch finden auch hier die Photosynthese und Mitose nicht parallel zueinander statt, sondern die Photosynthese wird für die Dauer der Zellteilung eingestellt. Aufgrund dessen kann das eingestrahelte Licht nicht so effektiv genutzt werden, da das Licht von etwa 2 Stunden (Dauer der Mitose [148]) fehlt. Eine Teilung in der Hellphase

findet vermutlich dann statt, wenn die Energiespeicher der Zelle gefüllt sind. Die Verbesserung der Lichtnutzungseffizienz kann der eigentliche Vorteil für die Verschiebung der Mitose in die Dunkelphase sein.

### **Einfluss auf die Kalzifizierung**

Wie Tabelle 4.2 zeigt, erreichen die Kulturen mit einer hohen Zell-Konzentration im Vergleich zu den anderen Versuchsreihen niedrigere Coccolithen-Konzentrationen. Aufgrund dieser Tatsache kann vermutet werden, dass die Coccolithenproduktion zu Gunsten des Wachstums der Zellen zurückgestellt wird. Eine Calcium-Limitierung oder Aufnahme-Limitierung konnte ausgeschlossen werden (siehe Kapitel 7.3.1). Eine Erklärung liefern die Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Linschooten et al. [125]. Sie konnte in ihren Experimenten beobachten, dass das Coccolithvesikel während der Mitose nicht in der Zelle vorhanden ist [125]. Dies führt zu der Annahme, dass die Zelle nicht in der Lage ist, die Zellteilung und Kalzifizierung gleichzeitig durchzuführen. Zudem wurden die höchsten Zell-Konzentrationen bei Hell-Dunkel-Zyklen erreicht. Die Untersuchungen von Müller et al. [148] zeigten in ihren Versuchen, dass sich die Kalzifizierung ebenfalls an die herrschenden Hell-Dunkel-Zyklen anpasst. Die Kalzifizierung wird in der G<sub>1</sub>-Phase durchgeführt, welche wiederum in der Hellperiode stattfindet [148]. Dadurch kann gewährleistet werden, dass die energieintensive Kalzifizierung nicht gleichzeitig mit dem sensiblen Prozess der DNS-Replikation stattfindet [28, 148, 214, 271]. Die Zellen in einem Hell-Dunkel-Zyklus müssen so die Kalzifizierung in der Dunkelphase aufgrund von fehlender Energie aussetzen, was die niedrigeren Coccolithen-Konzentrationen dieser Versuchsreihen erklärt. Es könnte vermutet werden, dass höhere Bestrahlungstärken in der Hell-Phase diese energetischen Aspekte wieder aufholen könnte. Tabelle 4.2 zeigt jedoch, dass eine hohe PFD nicht automatisch zu der höchsten Coccolithenzahl führt. So wird bei beiden getesteten Stämmen die höchste Konzentration bei 220  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  gemessen und nicht, bei 350  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , wie es aufgrund des Energiebedarfes der Kalzifizierung zu erwarten wäre. In den Versuchen von Mizukawa et al. [143] wurden vereinzelte Coccolithen in einem Magnetfeld ausgerichtet. Sie konnten dabei beobachten, dass es, je nach Winkel des einfallenden Lichtes, zu einer Zu- beziehungsweise Abnahme der optischen Intensität kam. Die Arbeitsgruppen konnte jedoch keine Aussage darüber treffen, ob die Coccolithen als Lichtschattierer oder Lichtsammler fungieren [143]. *Emiliana huxleyi* gilt jedoch als ein sehr lichttoleranter Organismus und selbst nicht-kalzifizierende Stämme können sehr hohe Lichtintensitäten von bis zu 800  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  tolerieren, wodurch es unwahrscheinlich ist, dass die Coccolithen als Lichtschattierer fungieren [76, 154, 173, 238]. Wenn die Coccolithen jedoch als Lichtsammler eingesetzt werden, so könnte eine PFD von 350  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  für diesen Zweck zu hoch gewesen sein, während eine PFD von 220  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  bereits im optimaleren Bereich lag. Es kann also vermutet werden, dass die Coccolithenanzahl, außer durch die zur Verfügung stehenden Energie, noch eine weitere Adaption an die Umgebungsbedingungen darstellt.

Für die Bestimmung des Anteils an nicht kalzifizierten Zellen wurden täglich die Zellen gezählt, die unter dem Mikroskop keine Coccolithen gebunden hatten (Kapitel 7.3.1, Abbildung 7.6). Diese wurden dann auf die Gesamtzellzahl bezogen. Die Folgende Tabelle 4.3 zeigt die maximal erreichten Werte beider Stämme.

Tabelle 4.3: Anteil an nicht-kalzifizierenden Zellen während der Hell-Dunkel-Versuche im Schüttelkolben

	CCMP3266	CCMP371
<b>12:12</b>	14,3 %	36,4 %
<b>15:9</b>	-	36,3 %
<b>220</b>	19,3 %	-
<b>350</b>	24,8 %	40 %

Paasche [171] vermutete, dass nackte Zellen (N-Zellen) eine laborspezifische Erscheinung sind und in älteren Kulturen auftreten. Aber auch ein Stickstoff- und Phosphatmangel wird mit dem Auftreten von N-Zellen in Verbindung gebracht [125]. In dem Versuch dieser Arbeit konnte allerdings zu keinem Zeitpunkt ein Mangel an diesen Nährstoffen beobachtet werden (siehe Kapitel 7.3.1). Der Anteil an nicht-kalzifizierten Zellen steigt bei Stamm CCMP371 zum Ende der Kultur. Diese Beobachtung konnte auch die Arbeitsgruppe von Balch et al. [7] in ihren Versuchen machen. In den Experimenten mit dem *E. huxleyi* Stamm 88E waren in der log-Phase etwa 95 % der Zellen mit Coccolithen umhüllt [7]. In der stationären Phase beginnen die Zellen damit die Coccolithen abzubauen [7]. Eine weitere Möglichkeit kann die Dauer der Kultivierung gewesen sein, da in längeren Kultivierungen die Zellen die Fähigkeit verlieren Coccolithen zu produzieren [250]. Wird jedoch der Verlauf der Zell-Konzentration beider Stämme berücksichtigt, so fällt auf, dass der Anteil der nicht-kalzifizierten Zellen kurz vor und nach Erreichen der maximalen Zell-Konzentration am höchsten ist. Dies könnte daran liegen, dass die Kulturen zu diesem Zeitpunkt einige Zellteilungen durchlaufen. Bei jeder Zellteilung wird auch die Coccusphäre eingeschnürt [106]. Womöglich könnten sich bei diesem Prozess Coccolithen aus der Coccusphäre gelöst haben, wodurch die Struktur instabil würde und die Zelle die Partikel verlieren könnte. Dafür würde sprechen, dass der Anteil an nicht-kalzifizierten Zellen gegen Ende der Kultivierung wieder abnimmt.

Die verwendeten Stämme zeigen ein unterschiedliches Verhalten auf die getesteten Lichtbedingungen. So erreichte die Versuchsreihe mit einem 15:9-Zyklus bei Stamm CCMP371 die niedrigsten Zell-Konzentrationen, während der Stamm CCMP3266 dabei die höchsten Zelldichten erreichte. Sequenzierungen des *E. huxleyi* Genoms zeigten große genetische Variabilität zwischen den Stämmen, wodurch das unterschiedliche Wachstumsverhalten der beiden getesteten Stämme erklärt werden könnte [21, 189]. Diese genetischen Unterschiede entstanden vermutlich daraus, dass *E. huxleyi* in allen Weltmeeren vorkommt und sich an die dort herrschenden Bedingungen anpassen musste [45]. Werden explizit die Stämme CCMP3266 und CCMP371 verglichen, beispielsweise über Expressed Sequence Tags (ESTs), ähneln sich lediglich 45 % der Sequenzen [44]. Bei ESTs handelt es sich um reverse Transkripte von mRNAs. Diese sind meistens nur kurze Abschnitte der Gesamtlänge der mRNA, die jedoch zur Identifizierung eines kodierenden Abschnittes eines Gens vollkommen ausreichen [108]. Neben ihren unterschiedlichen Wachstumsverhalten in Bezug auf Hell-Dunkel-Zyklen, konnte in den Versuchen von Matson et al. [136] beobachtet werden, dass Stamm CCMP3266 stets höhere Wachstumsraten erreicht. Dies zeigte sich auch in den Ergebnissen dieser Arbeit. Zudem konnte beobachtet werden, dass die Raten der täglichen Coccolithenablösung während des exponentiellen Wachstums bei Stamm CCMP371 höher waren. So erreichte Stamm CCMP371 bei einer Kultivierungstemperatur von 20 °C Werte

von bis zu  $17,8 \text{ Coccolithen} \cdot \text{Zellen}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  während Stamm CCMP3266 bei  $14,2 \text{ Coccolithen} \cdot \text{Zellen}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  lag [136]. Dies könnte erklären, warum der Anteil an nicht-kalzifizierten Zellen bei Stamm CCMP371 um ein Vielfaches höher war als bei Stamm CCMP3266.

#### 4.1.2 Übertragung der Hell-Dunkel-Zyklen auf einen Rührkesselreaktor

Da der Stamm CCMP3266 die höchste Zell-Konzentration und die kürzeste Lag-Phase in den Schüttelkolben besaß, wurde dieser Stamm für die Reaktorversuche ausgewählt. Diese Entscheidung wurde des Weiteren getroffen, da in den aufgearbeiteten Coccolithenproben von Stamm CCMP371 oft Schmutzpartikel und Zelltrümmer gefunden wurden, wodurch die Bestimmung der Coccolithen-Konzentration unter dem Mikroskop erheblich erschwert wurde. Zudem wurden viele zerbrochene Coccolithen gefunden, was vermutlich an der filigranen Struktur der Coccolithen des Stammes CCMP371 liegt (siehe Abbildung 4.1).

Auf Grundlage der Ergebnisse aus den Schüttelkolben, wurde ein 15:9-Zyklus mit einer PFD von  $350 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  für die Kultivierung in einem Rührkesselreaktor ausgewählt, da dieser zu der höchsten Zellzahl führte. Parallel wurde eine permanente Kultivierung mit einer PFD von  $350 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  durchgeführt, da diese Lichtintensität bisher in der Literatur zu den höchsten Zellzahlen geführt hat und es zu keiner stärkeren Lichtsättigung kommt [95]. Die Vorkulturen beider Reaktorversuche wurden vor Versuchsbeginn für zwei Wochen an die jeweiligen Lichtbedingungen adaptiert. Da die Probenahme zum Ende der Dunkel-Phase sowie in der Mitte der Hell-Phase statt fand, wurden die Zellzahlen, Coccolithen- und Nährstoff-Konzentrationen für das Ende der Hell-Phase in den folgenden Kapiteln approximiert. Der Reaktor mit einer permanenten Beleuchtung wurde zu denselben Zeiten beprobt. Aufgrund dieser Tatsache erfolgte in den folgenden Abschnitten bei der permanenten Kultivierung ebenfalls eine Einteilung in eine Hell- beziehungsweise Dunkelphase, obwohl diese tatsächlich nicht stattgefunden haben. Im Anhang unter Kapitel 7.3.1 findet sich eine ergänzende Diskussion, welche die Vorgänge auf molekularer Ebene beschreibt.

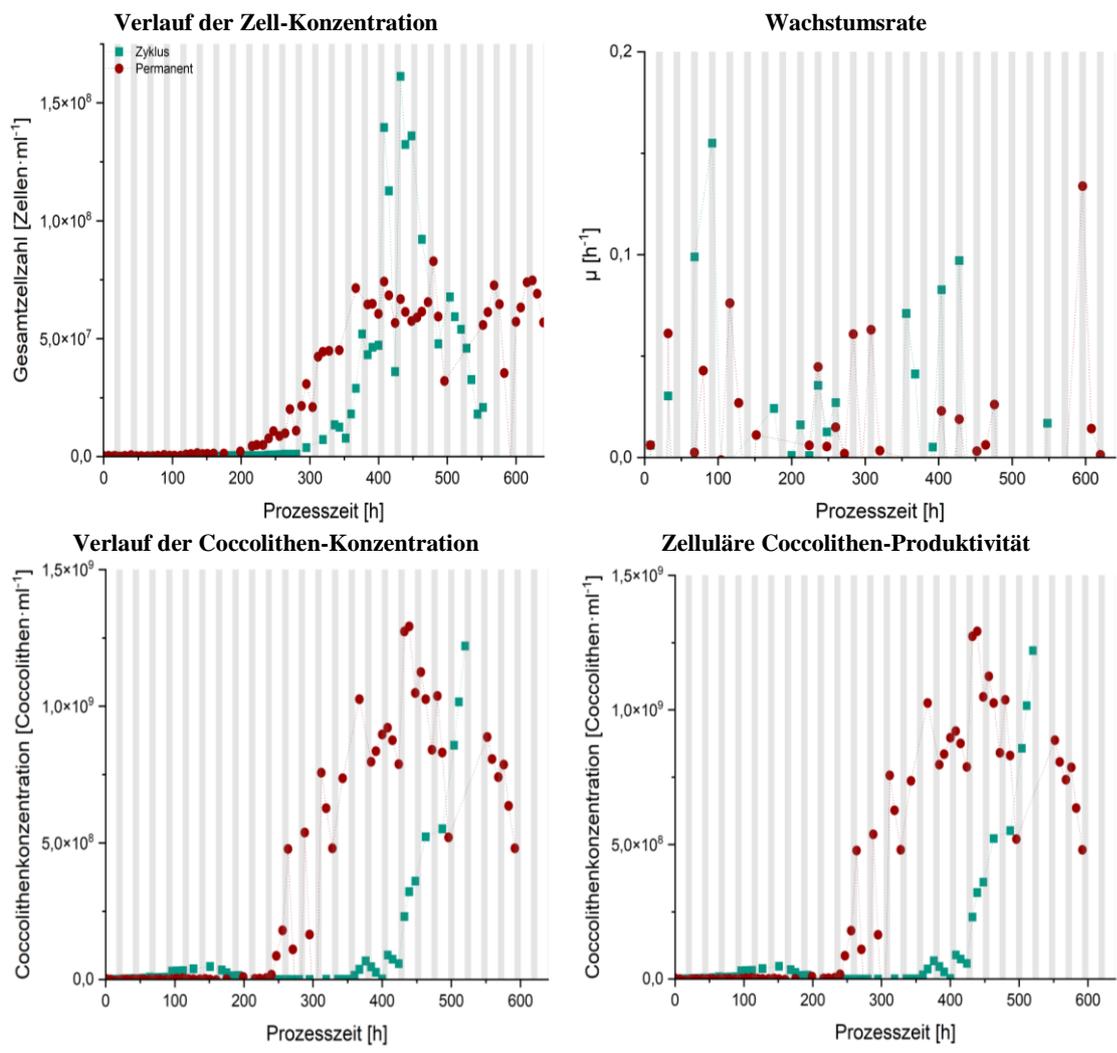


Abbildung 4.3: Zusammenfassung der Ergebnisse der Hell-Dunkel-Zyklen aus dem Rührkesselreaktor. Links: Verläufe der Zellzahl (oben) sowie der Coccolithen-Konzentration (unten) während der Kultivierung mit einem 15:9-Zyklus und einer permanenten Beleuchtung mit  $350 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Rechts: Darstellung der Wachstumsrate  $\mu$  (oben) und Coccolithen-Produktivität (unten). Die grauen Bereiche kennzeichnen die Dunkelphase während der Versuche

Abbildung 4.3 zeigt die Kurvenverläufe der Zellzahl, Coccolithen-Konzentration sowie die dazugehörigen Wachstumsraten und zelluläre Coccolithen-Produktivität während der Kultivierung mit einem 15:9-Hell-Dunkel-Zyklus sowie einer permanenten Kultivierung mit einer PFD von  $350 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

**Einfluss auf das Wachstum**

Die folgende Tabelle 4.4 gibt einen Überblick der erzielten Ergebnisse der Kultivierungen im Rührkesselreaktor mit einem 15:9-Zyklus und einer permanenten Beleuchtung mit einer PFD von  $350 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

#### 4.1 Der Einfluss von Hell-Dunkel-Zyklen auf das Wachstum und die Kalzifizierung von *Emiliania huxleyi*

Tabelle 4.4: Zusammenfassung der Ergebnisse der Rührkessel-Kultivierungen mit einem Hell-Dunkel-Zyklus und permanenter Beleuchtung

	15:9-Zyklus	Permanente Beleuchtung	
		Aufteilung wie Zyklen	Gemittelt über 24 h
<b>Gemittelte <math>r_{\text{Photonen, abs}}</math></b> [ $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{Zelle}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ]	$1,0 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$	
<b>Wachstum</b>			
<b>Maximal erreichte Zellzahl</b> [Zellen $\cdot \text{ml}^{-1}$ ]	$1,6 \cdot 10^8$	$6,9 \cdot 10^7$	
$\mu_{\text{gemittelt}}$ [ $\text{h}^{-1}$ ]	<b>Hellphase</b>	$5,9 \cdot 10^{-3}$	$2,0 \cdot 10^{-2}$
	<b>Dunkelphase</b>	$3,2 \cdot 10^{-2}$	
<b>Gemittelte Teilungszyklen</b>	<b>Hellphase</b>	0,1	0,6
	<b>Dunkelphase</b>	0,6	
<b>Kalzifizierung</b>			
<b>Maximale Coccolithen-Konzentration</b> [Coccolithen $\cdot \text{ml}^{-1}$ ]	$1,0 \cdot 10^9$	$1,2 \cdot 10^9$	
<b>Gemittelte <math>R_{P,C}</math></b> [Coccolithen $\cdot \text{Zelle}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ]	<b>Hellphase</b>	<b>0,4</b>	0,2
	<b>Dunkelphase</b>	<b>1,5</b>	

In beiden Kultivierungen konnten höhere Zell-Konzentrationen erreicht werden als in bisherigen Reaktor-Kultivierungen ( $3,1 \cdot 10^7$  Zellen  $\cdot \text{ml}^{-1}$ ) [75]. Die erreichte Zell-Konzentration des 15:9-Hell-Dunkel-Zyklus ist im Vergleich zur Kultivierung mit einer kontinuierlichen Beleuchtung 2,3-mal so hoch. Im Vergleich zu den Schüttelkolbenversuchen aus Kapitel 4.1.1 sind die erreichten Wachstumsraten beider Kulturen im Rührkesselreaktor jedoch niedriger. Dies könnte dadurch resultieren, da die im Lichtmantel des Rührkesselreaktors verbauten LEDs, auf eine größere Fläche verteilt sind. Die Lichtverfügbarkeit für die Zellen ist dadurch geringer, was zu einem verlangsamteten Wachstum führen kann. Aufgrund der Reaktorgeometrie und der geringen gegenseitigen Abschattung der Zellen, kann dieser Effekt jedoch ausgeschlossen werden.

Ein Großteil der Arbeitsgruppen, die sich mit der Untersuchung des Wachstums in Hell-Dunkel-Zyklen beschäftigt hat, fokussiert sich auf die Vorgänge in der Dunkelphase und vernachlässigt dabei die Prozesse in der Hellphase. Wie schon die Vorversuche in den Schüttelkolben zeigten und wie es andere Arbeitsgruppen bestätigen, teilt sich *E. huxleyi* bevorzugt in der Dunkelphase [99, 109, 125, 148, 158, 168, 249]. Die Ergebnisse aus Tabelle 4.4 zeigen jedoch auch, dass sich *E. huxleyi*, wie auch die meisten anderen Algenarten, auch bei permanenter Beleuchtung teilen kann. Wie bereits in Kapitel 4.1.1 erwähnt wurde, führt eine Zellteilung in der Hellphase zu einer geringeren Lichtnutzungseffizienz. Dies liegt daran, dass sich *E. huxleyi* binär teilt [109]. Dabei erfolgt die Teilung in zwei gleiche Zellen [151]. Dafür müssen die zellulären Komponenten auf die Mutter- und Tochterzelle aufgeteilt werden. So werden die Chloroplasten vermehrt, die dadurch von zwei auf vier ansteigen [106]. Es ist nicht bekannt, ob die Zellen ihre Chloroplasten gleichzeitig oder nacheinander teilen. Die Versuche von Kaftan et al. [102] zeigten, dass die Anzahl der aktiven Photosystem-II-Zentren von *Scenedesmus quadricauda*, bei der Kultivierung in einem 16:8-Hell-Dunkel-Zyklus, während der Zellteilung ein Minimum erreichte. Auch andere Arbeitsgruppen konnten eine Abnahme der photosynthetischen Aktivität mit dem Beginn der Zellteilung beobachten [220]. Die Arbeitsgruppe von Müller et al. [148] fanden wiederum heraus, dass die S- und  $G_2+M$ -Phase bei dem *E. huxleyi* Stamm CCMP371 eine Dauer von 2,2 Stunden

beziehungsweise 2,5 Stunden ausmacht. Die genaue Dauer der Mitose ist unbekannt, bei der marinen Alge *Monostroma angicava* beträgt sie beispielsweise etwa 50 Minuten [86]. Zusammenfassend bedeutet das, dass die Zelle für die Dauer der Zellteilung ( $\sim 2,5$  h) das einfallende Licht nicht nutzen kann. Dies würde ein Photonenverlust von 8 % entsprechen. Die Zellen teilen sich unter optimalen Wachstumsbedingungen trotzdem auch bei permanenten Licht, vermutlich dann, wenn die intrazellulären Energiespeicher gefüllt sind. Durch eine Verschiebung der Zellteilung in die Dunkelphase, kann die Zelle den Lichtverlust umgehen. So werden in der Hellphase die Energiespeicher gebildet, die für die Teilung in der Dunkelphase genutzt werden können.

Die Wachstumsraten bei der permanenten Kultur sind um ein vielfaches niedriger, als bei der Kultur mit einem Hell-Dunkel-Zyklus und sind nicht durch den im vorherigen Absatz erwähnte Photonenverlust begründbar. Hohe Lichtintensitäten können in der Zelle photoinduzierte Schäden verursachen. Die DNA ist dabei besonders gefährdet [247]. Durch kovalente Modifikationen benachbarter Pyrimidine kommt es zu einer Verzerrung der DNA-Doppelhelix [3, 108]. Daneben kann es zur Bildung reaktiven Sauerstoffspezies kommen, was in Folge zu Lipid- und Proteinoxidation führen kann [247]. Die Zellen haben verschiedene Strategien entwickelt, um diese Schäden zu beheben. Photolyasen benutzen beispielsweise blaues Licht, um photoinduzierte Schäden in der DNA zu reparieren [15, 108, 201]. Ein weiterer Reparaturmechanismus involviert die DNA-Bindungsproteine DDB1 und DDB2. Zusammen bilden diese den UV-DDB-Komplex, der UV-induzierte Schäden erkennt und im Folgenden die Reparatur induziert [90, 247]. Die Arbeitsgruppe von Allakhverdiev [2] konnte in ihren Versuchen beobachten, dass Zellen die einer sehr hohen Lichtintensität ( $2000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) ausgesetzt waren, ihre Photoschäden in völliger Dunkelheit schneller regenerierten als die Vergleichskulturen unter Standard-Lichtintensitäten ( $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) [2]. Dies könnte bedeuten, dass die Zellen dieser Arbeit mit einer permanenten Beleuchtung ihre photoinduzierten Schäden langsamer repariert haben, was sich negativ auf die Wachstumsrate ausgewirkt haben kann. Dies kann wiederum dazu geführt haben, dass diese Zellen vermehrt Coccolithen produziert haben, um diese als Lichtschattierer (siehe Kapitel 4.1.1) zu verwenden [143].

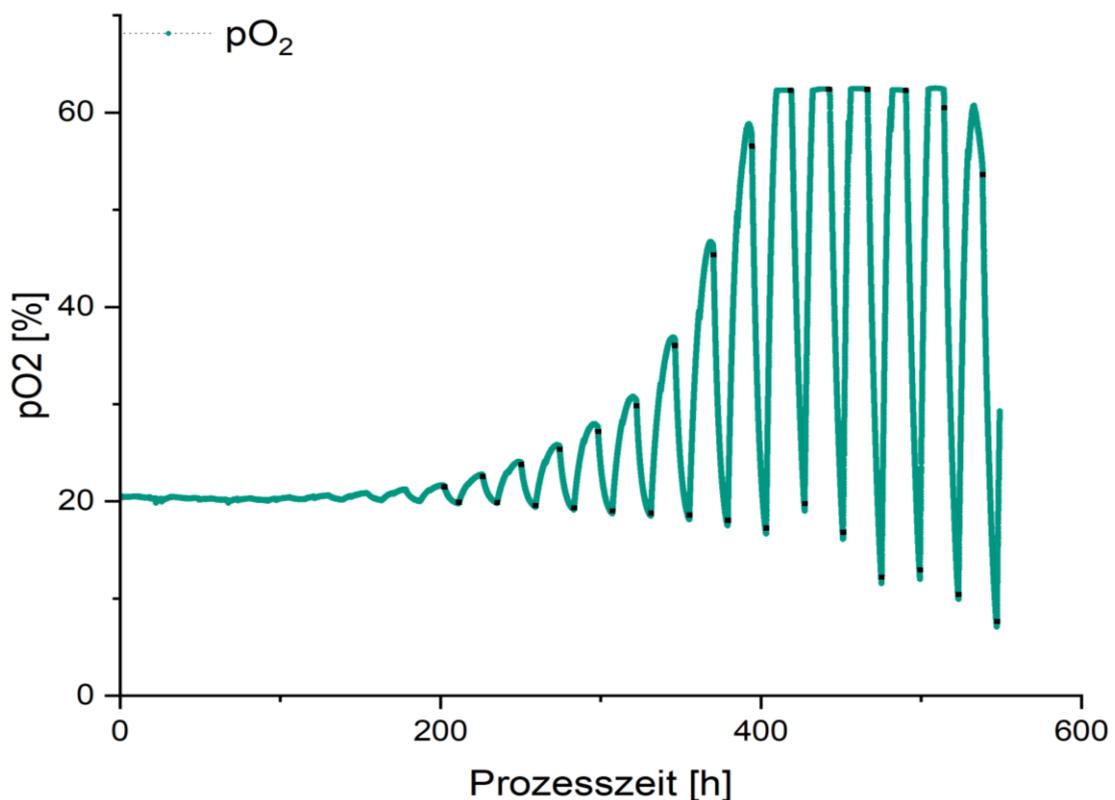


Abbildung 4.4: Verlauf des  $p_{O_2}$  während der Kultivierung mit einem 15:9-Hell-Dunkel-Zyklus. Die schwarzen Punkte markieren den Start der Dunkel-Phase ab einer Prozesszeit von 200 h

Abbildung 4.4 zeigt den Verlauf des Sauerstoffpartialdrucks ( $p_{O_2}$ ) und das exponentielle Wachstum der Zellen in einem Hell-Dunkel-Zyklus. Der durch die Photosynthese in der Hellphase entstandene Sauerstoff lässt den Partialdruck ansteigen [182]. In der Dunkelphase wird der Sauerstoff hingegen durch die Atmung verbraucht, wodurch es zu einer Abnahme des  $p_{O_2}$ -Gehaltes kommt. Ohne Licht metabolisieren die Zellen die Speicherkomponenten, um die Erhaltungsenergie und die Energie zur Zellteilung zu gewinnen, was zu einer Abnahme des Zellgewichtes führt [164, 166]. Je mehr Zellen sich in der Kultur befinden, desto höher wird der  $p_{O_2}$ -Gehalt in der Hellphase und desto stärker sinkt er in der Dunkelphase. Ab einer Prozesszeit von 200 Stunden ist im täglichen Anstieg des  $p_{O_2}$ -Gehaltes in der Hellphase eine leichte Schulterbildung zu erkennen. Diese Schulter tritt täglich zur selben Uhrzeit (~16 Uhr) auf und führt zu einem Abstieg des Gehaltes um 0,3-1,6 %. Zu dieser Uhrzeit wurde der Reaktor beprobt und anschließend mit nicht begasten Medium aufgefüllt, wodurch diese Abnahme zu erklären ist. Des Weiteren war der  $p_{O_2}$ -Gehalt ab einer Prozesszeit von 400 Stunden so hoch, dass dabei der Maximalwert der Sonde überschritten wurde, wodurch das Signal ab einem Wert von 60 % nicht aufgezeichnet werden konnte.

Abbildung 4.5 zeigt beispielhaft den  $p_{O_2}$ -Gehalt kurz vor der Dunkelphase zur Prozesszeit 393 h. Bei einer genauen Betrachtung des  $p_{O_2}$ -Signals kann beobachtet werden, dass der Gehalt etwa 1,5 Stunden vor Beginn der Dunkelphase um 0,52 % absinkt. Ungefähr 10 Minuten vor Eintritt in die Dunkelphase kommt es dann zu einem plötzlichen Abfall von etwa 0,38 %. Diese Beobachtung lässt sich durch mehrere Vermutungen begründen. Zum einen benötigen die Zellen, wie bereits

erwähnt wurde, gefüllte intrazelluläre Energiespeicher für die Teilung. Ein Absinken des  $p_{O_2}$  lässt daher vermuten, dass die Zellen bereits alle benötigten Komponenten für die Zellteilung(en) sowie die Energiespeicher synthetisiert haben, bevor die Dunkelphase begann. Des Weiteren kann das Absinken ein Indiz dafür sein, dass die Zellteilung durch eine innere Uhr reguliert wird, wie es auch andere Arbeitsgruppen postulieren (eine ausführliche Betrachtung dieser Hypothesen ist im Anhang unter Kapitel 7.3.1 zu finden).

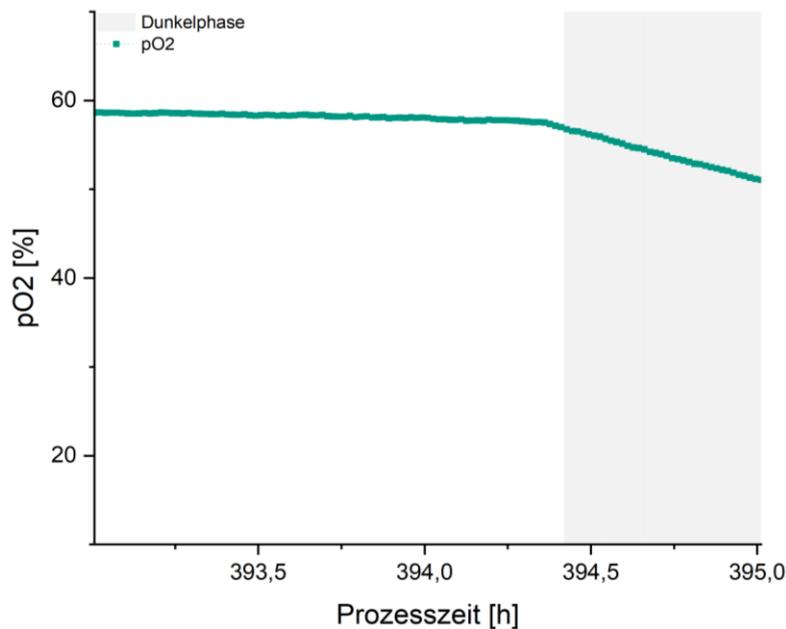
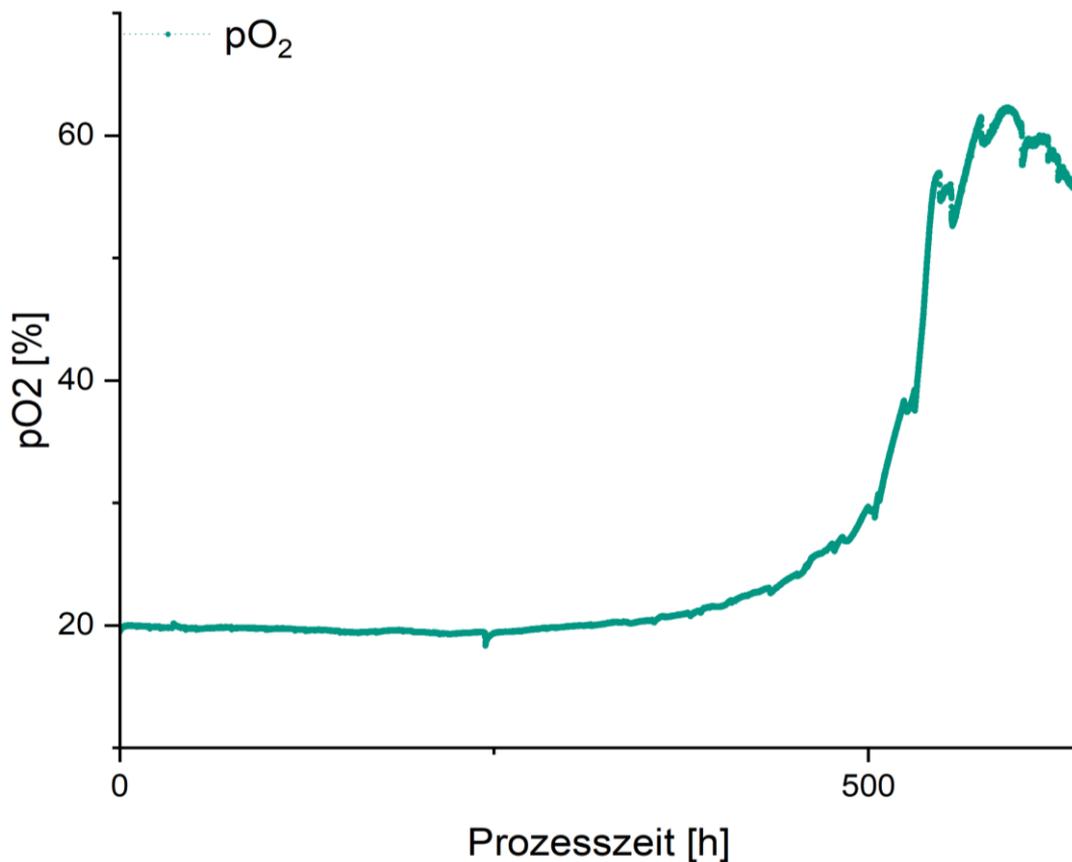


Abbildung 4.5: Verlauf des  $p_{O_2}$  kurz vor Beginn der Dunkelphase

Das  $p_{O_2}$ -Signal der Kultur mit einer permanenten Beleuchtung zeigt keine Synchronisation des Wachstum (siehe Abbildung 4.6). Auch bei einer detaillierten Betrachtung der Werte, kann bis auf ein leichtes Absinken des Signals zur Probenahmezeit kein auffälliger Verlauf beobachtet werden. Da die Zellen dort kontinuierlich Photosynthese betreiben können, steigt der  $p_{O_2}$  exponentiell mit der Zellzahl an. Allerdings steigt dieser gegen Ende der Kultivierung stark an, obwohl die Zellzahl konstant bleibt.

Abbildung 4.6: Verlauf des pO<sub>2</sub> während der Kultivierung mit einer permanenten Beleuchtung

In dieser Arbeit durchläuft die Kultur mit einem Hell-Dunkel-Zyklus in der Dunkelphase 1,32 Teilungszyklen (Berechnung nach Gleichung 3.2, Kapitel 3.6). Ein Teil der Zellen ist somit in der Lage mindestens zwei Zellteilungen durchzuführen. Die Arbeitsgruppe von Kottmeier et al. [109] konnte bei der Kultivierung des Stammes RCC1216 (entspricht dem hier verwendeten Stamm CCMP3266) in einem 16:8-Zyklus beobachten, dass sich etwa 50 % der Zellen die sich bereits einmal geteilt hatten, noch einmal teilen. Es ist jedoch unklar, wie die Zellen die zwei Teilungszyklen organisieren. Algen, die mehrere Tochterzellen produzieren, wie beispielweise *Chlamydomonas reinhardtii*, waren bereits oft Gegenstand von Arbeiten zur Untersuchung mehrfacher Zellteilungen. Dabei konnten mehrere aufeinanderfolgende Restriktionspunkte gefunden werden, welche zu mehreren Zellteilungen führten [266]. In diesem Zusammenhang spielt die Histon-H1-Kinase eine wichtige Rolle. Vor einem R-Punkt stieg die Kinase-Aktivität an und nach Erreichen des Maximums wurde die Zelle zur Teilung verpflichtet, da die Zelle ab Überschreiten des R-Punktes keine Möglichkeit mehr besitzt den Zellzyklus zu unterbrechen [265]. Wenn in der Beleuchtungsperiode zwei oder drei Peaks der Histon-H1-Kinase-Aktivität gemessen wurden, fanden in der Dunkelphase zwei bis drei Runden der Reproduktionsprozesse statt, wodurch vier oder acht Tochterzellen gebildet wurden [265]. *E. huxleyi* teilt sich, wie bereits erwähnt wurde, jedoch binär, also in zwei gleiche Zellen [109]. Das bedeutet, dass sie sich nur einmal während einer DNS-Replikations-Teilungssequenz teilen kann [109]. Damit die Zelle sich mehr als einmal

pro Tag teilen kann, muss eine weitere DNS-Replikations-Phase stattfinden [109]. Da die Synthese der Bausteine der Nukleinsynthese nur während der Hellphase in der  $G_1$ -Phase stattfindet, müssen die Zellen dabei bereits genug Komponenten hergestellt haben, um die Zellteilung zweimal durchführen zu können. Wie bereits in der Diskussion der Schüttelkolbenversuche gezeigt wurde, ist die Lichtverfügbarkeit in der Hellphase entscheidend für den Verlauf des Zellzyklus, da nicht nur die Komponenten für die Zellteilung synthetisiert, sondern auch die benötigten Energiespeicher gebildet werden. Da ein Teil der Zellen sich mehr als einmal teilt, ist es gewiss, dass die Lichtverfügbarkeit in der Hellphase ausreichend war. Es ist allerdings auch denkbar, dass bei ausreichend gefüllten Speichern auch in der Dunkelphase eine Nukleinsynthese stattfinden kann.

Nach Erreichen der maximalen Konzentration während des Hell-Dunkel-Zyklus nimmt die Zellzahl schnell ab. Diese rapide Abnahme könnte dann auftreten, wenn ein vollständiger Nährstoffverbrauch stattgefunden hätte. Durch das regelmäßige Auffüllen des Reaktors kam es jedoch zu keinem Zeitpunkt zu einer Limitierung an Phosphat, Nitrat und Calcium (siehe unten). Eine Aussage über andere Elemente kann allerdings nicht getroffen werden. Eine weitere Möglichkeit, die die Abnahme der Zellzahl erklären könnte lautet, dass die Zellen Aggregate bilden und sich als Folge dessen an den Reaktorwänden anhaften oder auf den Reaktorboden sinken. Letzteres konnte während der Kultivierung beobachtet werden. Da die Zellen mit Coccolithen eine höhere Dichte als das Kultivierungsmedium besitzen, kann dies zum Absinken beigetragen haben. Des Weiteren befinden sich Polysaccharide auf der Zelloberfläche, wodurch sich die Zellen an Oberflächen oder anderen Zellen anhaften [53]. Aber auch die Coccolithen sind zeitweise von sauren Polysacchariden bedeckt, wodurch auch sie zu der Aggregatbildung beitragen [53, 243]. Eine Aggregatbildung konnte während der Kultivierung im Reaktor unter dem Mikroskop nicht beobachtet werden, jedoch wurden Aggregate zuvor in den Schüttelkolbenkulturen gefunden (siehe Anhang Kapitel 7.3.1). Um diesen Effekt entgegenzuwirken, kann die Rührerdrehzahl erhöht werden. Allerdings erhöhen sich dadurch auch die Scherkräfte auf die Zellen, wodurch die Algen und Coccolithen beschädigt werden [144].

### **Einfluss auf die Kalzifizierung**

Im Vergleich zu den Vorversuchen im Schüttelkolben ist die erreichte Coccolithen-Konzentration während der Kultivierung mit einem Hell-Dunkel-Zyklus nicht viel niedriger als bei einer permanenten Beleuchtung. Die Kalzifizierung ist, wie bereits erwähnt wurde, aufgrund des Energiebedarfes ein lichtabhängiger Prozess. Der Energieaufwand für ein Mol  $\text{CaCO}_3$  liegt bereits bei 4,6 Mol Photonen [5, 171, 188]. Wenn davon ausgegangen wird, dass die Gesamtkosten für photosynthetisches Wachstum bei 24 Mol Photonen pro Mol  $\text{CO}_2$  liegt, entspricht der Energieaufwand für die Bildung von  $\text{CaCO}_3$  etwa 19 % der benötigten Energie für das Wachstum, was einen enormen Energiebedarf darstellt [188]. Da die erreichte Zell-Konzentration des Zyklus deutlich höher ist als die der permanenten Kultur, könnte dies die verschlechterte Kalzifizierung ausgleichen. Irritierend ist jedoch, dass die gemittelte Coccolithen-Bildungsrate in der Hellphase einen Wert von  $0,04 \text{ Coccolithen} \cdot \text{Zelle}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  erreicht, während sie in der Dunkelphase mit  $0,08 \text{ Coccolithen} \cdot \text{Zelle}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  doppelt so hoch ist.

Die Coccolithen-Konzentration der permanenten Kultur ist trotz der niedrigeren Zell-Konzentration höher und erreicht früher das Maximum. Dies liegt vermutlich zum Einen an der höheren

Lichtverfügbarkeit sowie an der Tatsache, dass die Kalzifizierung bei der Zyklus-Kultur nur in der Hellphase stattfindet [7, 81]. Wie zudem bereits in den vorherigen Abschnitten beschrieben wurde, kann eine erhöhte Coccolithen-Konzentration auch durch die Funktion als Lichtschattierer resultieren. Des Weiteren könnte die Energie, die während der Mitose nicht für die Photosynthese genutzt werden kann, in die Coccolithenproduktion umgelenkt werden.

Zudem fällt auf, dass die Coccolithen-Produktivität der permanenten Kultur zum theoretischen Zeitpunkt der Dunkelphase mit  $1,5 \text{ Coccolithen} \cdot \text{Zelle}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  im Vergleich zu den anderen Werten sehr hoch ist (siehe Tabelle 4.4). Dieser Wert ist über den Zeitraum der linearen Wachstumsphase gemittelt. Grundsätzlich besteht die Cocosphäre einer Zelle aus 10-15 Coccolithen [93, 253]. Die Dauer der Produktion einer einzelnen Coccolithe ist jedoch unbekannt. Es ist daher schwer einzuschätzen, ob der Bereich der Messwerte der Reaktorkultivierung mit  $0,04\text{-}4,89 \text{ Coccolithen} \cdot \text{Zelle}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  zu hoch beziehungsweise zu niedrig ausfallen. Wird die Coccolithen-Produktivität jedoch über 24 Stunden gemittelt, so wird mit  $0,2 \text{ Coccolithen} \cdot \text{Zelle}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  ein deutlich niedrigerer Wert erreicht. Dadurch wird die Vermutung verstärkt, dass bei einer Einteilung in nicht vorhandene Hell-Dunkel-Phasen die Ergebnisse stark verzerrt werden.

### Der Nährstoffverbrauch während der Kultivierungen

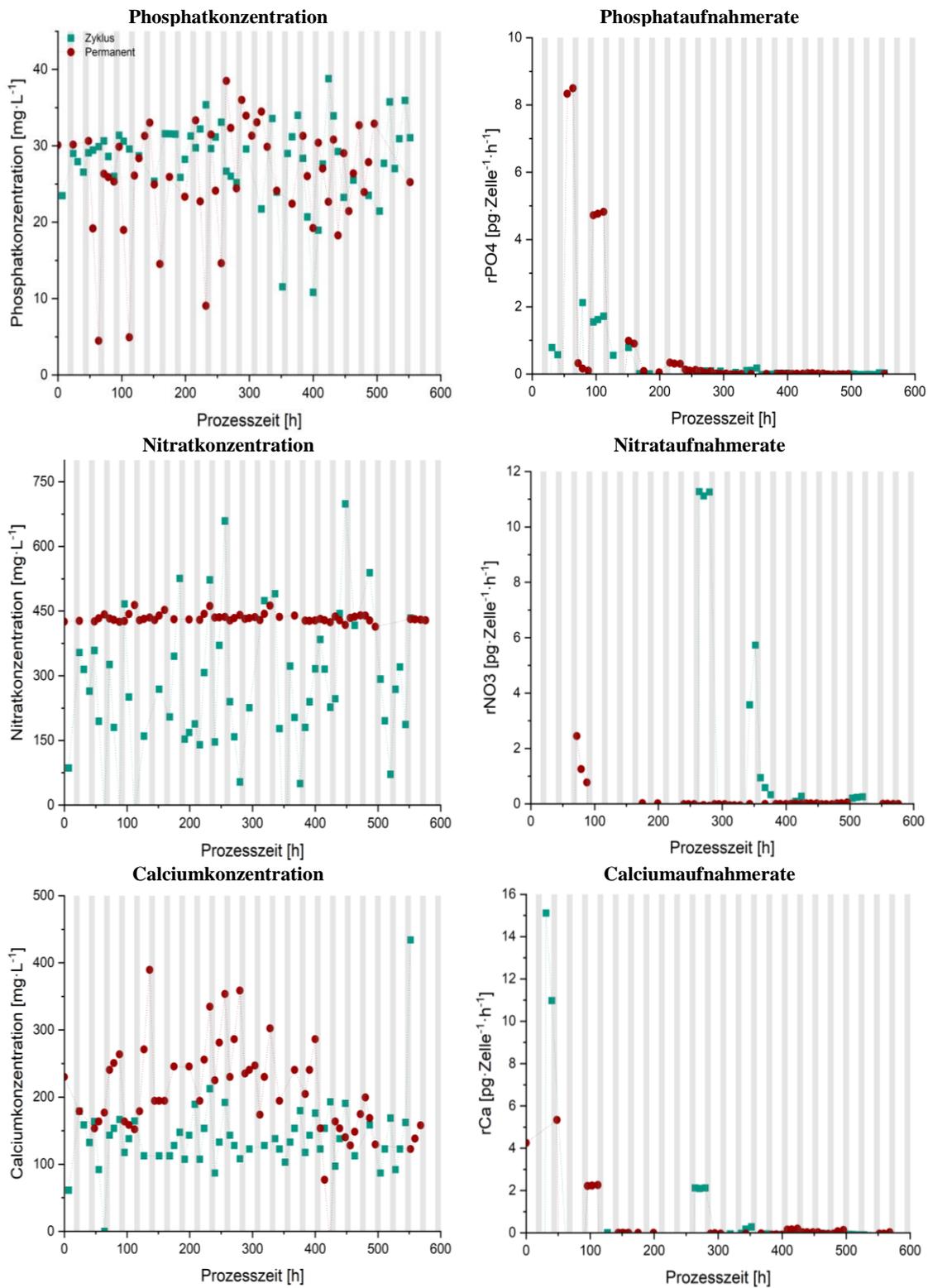


Abbildung 4.7: Verlauf der Konzentrationen sowie der Aufnahmeraten von Phosphat, Nitrat und Calcium während der Kultivierungen im Rührkesselreaktor mit einem 15:9-Hell-Dunkel-Zyklus und mit einer permanenter Beleuchtung mit einer PFD von  $350\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

In Tabelle 4.5 sind die Ergebnisse bezüglich des Nährstoffverbrauches beider Kultivierungen zusammengefasst.

Tabelle 4.5: Zusammenfassung des Verbrauches an Phosphat, Calcium und Phosphat während der Kultivierung im Rührkesselreaktor mit einem 15:9-Hell-Dunkel-Zyklus sowie einer permanenten Beleuchtung

		15:9-Zyklus	Permanente Beleuchtung
<b>Phosphatverbrauch [mg·L<sup>-1</sup>]</b>		120	140
<b>Gemittelte Phosphataufnahmerate [pg·Zelle<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>]</b>	<b>Hellphase</b>	0,03	0,11
	<b>Dunkelphase</b>	-	-
<b>Nitratverbrauch [mg·L<sup>-1</sup>]</b>		2298,7	219,2
<b>Gemittelte Nitrataufnahmerate [pg·Zelle<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>]</b>	<b>Hellphase</b>	2,89	-
	<b>Dunkelphase</b>	-	0,14
<b>Calciumverbrauch [mg·L<sup>-1</sup>]</b>		331,9	1149,3
<b>Gemittelte Calciumaufnahmerate [pg·Zelle<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>]</b>	<b>Hellphase</b>	0,35	-
	<b>Dunkelphase</b>	0,02	3,04

Es ist zu erkennen, dass die Kultur mit einem Hell-Dunkel-Zyklus weniger Phosphat verbraucht hat, obwohl sie im Vergleich zur Kultivierung mit einer permanenten Beleuchtung eine deutlich höhere Zell-Konzentration erzielte. Wird davon ausgegangen, dass der Phosphoranteil an der Biomasse 3,16 % ausmacht, würde es in der Zyklus-Kultur zu einer Biomassenzunahme von 1,2 g·L<sup>-1</sup> kommen, während es bei der permanenten Kultur 1,4 g·L<sup>-1</sup> sind [182]. Der höhere Verbrauch an Phosphat könnte durch den Phosphoranteil in den Coccolithen erklärt werden. So liegt der Anteil an P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> bei 0,392 %, was bei dem gemessenen Coccolithengewicht von 0,55 pg für die Kultur mit einem Hell-Dunkel-Zyklus zu einem Phosphorverbrauch von 0,2 mg·ml<sup>-1</sup> und für die permanente Kultur zu 0,3 mg·ml<sup>-1</sup> führt [93]. Allerdings wurde in beiden Kulturen zu wenig Phosphor verbraucht, um diesen Bedarf zu decken (0,039 mg·ml<sup>-1</sup> für die Zykluskultur, 0,046 mg·ml<sup>-1</sup> für die permanente Kultivierung). Dieses Ergebnis wird jedoch maßgeblich durch zwei Faktoren beeinflusst: Zum einen spielt das Coccolithengewicht eine große Rolle, zum anderen der Anteil von Phosphor in den Coccolithen. Im Laufe dieser Arbeit zeigt sich, dass es sich dabei nicht um starre Werte handelt.

Während der Kultivierung mit einem Hell-Dunkel-Zyklus liegt die Phosphataufnahmerate zu Beginn bei 2,12 pg·Zelle·h<sup>-1</sup> und nimmt im Verlauf der Kultivierung ab. Werden die Aufnahmeraten über die exponentielle Wachstumsphase gemittelt, so nehmen die Zellen in der Hellphase durchschnittlich 0,03 pg·Zelle·h<sup>-1</sup> auf, während in der Dunkelphase keine Aufnahme beobachtet werden kann. Während der permanenten Kultivierung zeigt sich ein ähnlicher Effekt. So ist die gemittelte Phosphataufnahmerate zum Zeitpunkt der Hellphase mit 0,11 pg·Zelle·h<sup>-1</sup> zwar deutlich höher, aber auch zum Zeitpunkt der Dunkelphase kann keine Phosphataufnahme beobachtet werden. Die Ergebnisse zeigen, dass unabhängig davon ob mit einem Hell-Dunkel-Zyklus oder mit permanenter Beleuchtung kultiviert wurde, in der Nacht bei beiden Kulturen keine Phosphataufnahme stattfand. In den Untersuchungen von Hernández Limón et al. [81] konnte beobachtet werden, dass 28 % der Gene, die mit dem Phosphorstoffwechsel im Zusammenhang stehen, ein Hell-Dunkel-Expressionsmuster zeigen[81]. Dabei zeigte sich auch, dass das Expressionsmuster der anorganischen Diphosphatase ihr Maximum zum Ende der Dunkelphase erreicht [81]. Dieses Enzym wird für die Nukleinsäuresynthese benötigt und lässt erneut eine zeitliche Regulation des Zellzyklus

vermuten [103]. Diese Befunde und die experimentellen Beobachtungen dieser Arbeit stimmen mit der summarischen Aussage überein, dass nachts keine Neusynthese von Nukleinsäuren erfolgt. Ob dies auch für die Zellen mit doppelter Teilung gilt, bleibt jedoch offen. Wenn diese „innere Uhr“ genetisch festgelegt ist, könnte dies erklären, warum die permanente Kultur ebenfalls eine höhere Anzahl an Teilungszyklen zu dem Zeitpunkt, in dem die Dunkelphase stattfinden würde, aufwies. Allerdings wurde Stamm CCMP3266 vor der Küste Neuseelands isoliert und wird die Zeitzonenverschiebung berücksichtigt, so fanden die Hell-Dunkel-Zyklen dieser Arbeit genau entgegengesetzt zum natürlichen Tag-Nacht-Rhythmus statt. Es sehr wahrscheinlich, dass sich eine „innere Uhr“ innerhalb einiger Zellgenerationen in Phase und Dauer an die tatsächlichen Bedingungen anpasst, da es auch im Meer zu Verdriftungen kommt. Da die permanente Kultur aber zu keinem Zeitpunkt an die hier verwendeten Zyklen synchronisiert wurde, scheint eine mögliche „innere Uhr“ nicht den gesamten Prozess zu erklären.

In der Kultur mit einem Hell-Dunkel-Zyklus liegt die Nitratverbrauchsrate zu Beginn bei  $11,3 \text{ pg} \cdot \text{Zelle} \cdot \text{h}^{-1}$  und sinkt im Verlauf der Kultivierung ab. Wie bereits bei der Phosphataufnahme beobachtet werden konnte, kann in der Hellphase zwar eine Aufnahme beobachtet werden, jedoch nicht in der Dunkelphase. Mit Hilfe der neugebildeten Biomasse aus dem vorherigen Absatz und den Angaben der makromolekularen Zusammensetzung aus Kapitel 4.2.1 konnte berechnet werden, wie hoch der Stickstoffbedarf für die Synthese von Proteinen, DNS und RNS ist. Dabei zeigt sich, dass die Kultur mit einem Hell-Dunkel-Zyklus viel mehr Stickstoff aufgenommen hat, als für die Synthese der Zellkomponenten benötigt wird (N-Restkonzentration:  $283,8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), während es bei der permanenten Kultur zu wenig war (um  $123,6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Im Vergleich zu der Kultivierung mit einem Hell-Dunkel-Zyklus zeigt die Nitrataufnahmerate einen gegensätzlichen Trend. So konnte in der Hellphase keine Nitrataufnahme beobachtet werden, während in der Dunkelphase ein gemittelter Wert von  $0,14 \text{ pg} \cdot \text{Zelle} \cdot \text{h}^{-1}$  erreicht wird.

Da sich die Zellen mit einem Hell-Dunkel-Zyklus während der Hellphase in der  $G_1$ -Phase befinden und in dieser Phase Strukturen wie Proteine synthetisieren werden, ist es plausibel, dass in der Hellphase die Nitrataufnahmerate höher ist [99, 148, 197]. So konnten auch andere Arbeitsgruppen beobachten, dass die Stickstoffaufnahme in der Dunkelphase verringert ist [195, 245]. In Versuchen mit *Desmodesmus quadricauda* konnte beobachtet werden, dass bei der Überführung der Kulturen in Dunkelheit die Akkumulation von RNS und Proteinen aufhörte und die Konzentrationen konstant blieben, wohingegen Stärke abgebaut wurde [264]. Bei *E. huxleyi* wäre dies der Zeitpunkt, in dem die Zellen in die S-Phase übergehen. Von dieser ist bekannt, dass dort der Stickstoffbedarf sinkt, da die Proteinbiosynthese unterdrückt wird [148]. Die Untersuchungen von Hernández Limón et al. [81] zeigten, dass 38 % der Gene, die mit dem Stickstoffstoffwechsel im Zusammenhang stehen, ein Hell-Dunkel-Expressionsmuster aufweisen. Dabei zeigten die Expressionsmuster für die Gene der Ammonium-, Harnstoff- und Nitrattransporter ein Maximum in der Dunkelphase [81]. Diese Erkenntnis scheint auf den ersten Blick unvereinbar mit den Ergebnissen dieser Arbeit zu sein, jedoch ist die Funktion der Transporter nicht darauf beschränkt die Stickstoffverbindungen in die Zelle zu schleusen, sondern auch den Stickstoff für die wachstumsbezogenen Prozesse zu bewegen [81]. Unklar ist, warum die Nitrataufnahmerate der permanenten Kultur zum Zeitpunkt der Dunkelphase stattfindet. In *C. vulgaris* konnten beobachtet werden,

dass die Zelle in der Dunkelphase Proteine aufbauen kann, was zu einem Abbau der intrazellulären Speicherkomponenten führt [166]. Eine Proteinsynthese ist mit der Stickstoffaufnahme gekoppelt und könnte die Nitrataufnahme erklären.

Anders als bei der Aufnahme von Nitrat und Phosphat, kann bei der Kultivierung mit einem Zyklus sowohl in der Hell-als auch in der Dunkelphase eine Calciumaufnahme beobachtet werden. Der Wert in der Dunkelphase fällt jedoch deutlich geringer aus und kann aus Schwankungen durch die Nachweismethode resultieren. Die Bestimmung des Coccolithengewicht ergab einen Wert von 0,55 pg. Der dadurch resultierende Calciumbedarf von 195,7 mg·L<sup>-1</sup> kann vollständig gedeckt werden. Die Calciumverbrauchsrate bei der permanenten Kultur liegen zu Beginn bei einem Wert von etwa 7 pg·Zelle<sup>-1</sup> und sinken anschließend im Verlauf der Kultivierung ab. In der Hellphase wird keine Aufnahme beobachtet, sondern nur in der Dunkelphase. Während der permanenten Kultur konnte keine Coccolithenmasse bestimmt werden. Die aufgenommene Calciummenge reicht allerdings aus, um den Anteil an Calcium an der Biomasse zu decken, selbst wenn das Coccolithengewicht bei einem Literaturwert von 2,5 pg liegt [241].

Linschooten et al. [125] beobachteten, dass die Zellen am Ende ihrer Lichtphase 2,13 pg Calcium·Zelle<sup>-1</sup> aufgenommen hatten. In der Versuchsreihe mit einem 15:9-Hell-Dunkel-Zyklus wird mit 2,06 pg Calcium·Zelle<sup>-1</sup> ein annähernd gleicher Wert erreicht. Die Versuchsreihe mit einer permanenten Beleuchtung erreicht jedoch mit 13,89 pg Calcium·Zelle<sup>-1</sup> einen vielfach höheren Wert. Da Linschooten et al. ebenfalls mit einem Hell-Dunkel-Zyklus kultivierten, könnte dieser erhöhte Wert auf die in dieser Arbeit beobachtete verbesserte Kalzifizierung der permanenten Kultur zurückzuführen sein. Da das Coccolithvesikel während der Mitose verschwindet und erst in den Tochterzellen wieder auftaucht, können die Kulturen mit einer hohen Anzahl von Teilungszyklen weniger Coccolithen bilden [125].

Im Vergleich zu den anderen Nährstoffen zeigt die Kultur mit einem Hell-Dunkel-Zyklus in der Dunkelphase ebenfalls eine, wenn auch geringe, Calciumaufnahme. Hernández Limón et al. [81] konnten beobachten, dass 27 % ihrer getesteten Kalzifizierungs-Gene ein Hell-Dunkel-Expressionsmuster zeigten [81]. Das calciumbindende Glutaminsäure-Prolin- und Alanin-reiche Ca<sup>2+</sup>-Protein (GPA) zeigt jedoch keine Anpassung an die Hell-Dunkel-Phasen [81]. Durch diese Aktivität in der Dunkelphase könnte die Calciumaufnahme erklärt werden. Allerdings wird der Einfluss von GPA eher im Kalzifizierungsprozess vermutet [42].

#### **4.1.3 Fazit der Kultivierung von *Emiliana huxleyi* unter Hell-Dunkel-Zyklen**

Während der Kultivierung mit den Stämmen CCMP3266 und CCMP371 zeigte sich, dass das Wachstum durch Hell-Dunkel-Zyklen stimuliert werden kann. Jedoch hatte dies einen Einbruch der Coccolithen-Konzentration zur Folge. Es wäre dadurch vorstellbar, dass zu Beginn der Kultivierung die Zellzahl durch den Einsatz der Zyklen erhöht werden könnte und nach Erreichen der maximalen Zell-Konzentration auf eine permanente Beleuchtung gewechselt wird, um die Coccolithenproduktion zu fördern. Da jedoch in den meisten Versuchen keine stationäre Phase erreicht wurde, ist es schwierig den passenden Zeitpunkt abzuschätzen. Leider war es aus zeitlichen Gründen nicht möglich, diesem Gedankengang weiter nachzugehen. Da jedoch bekannt war, dass im Laufe dieser Arbeit in deutlich größeren Reaktoren kultiviert werden sollte, bei denen ein

Abschirmen der äußeren Lichteinflüsse nicht möglich gewesen wäre, wurde im weiteren Verlauf auf das Einsetzen der Hell-Dunkel-Zyklen verzichtet.

Während der Coccolithenaufreinigungen viele der filigranen Coccolithen des Stammes CCMP371 zerstört wurden, werden die folgenden Versuche dieser Arbeit mit dem Stamm CCMP3266 durchgeführt.

## **4.2 Optimierung der Nährstoffverfügbarkeit des Mediums zur Coccolithenproduktion**

Für die Kultivierung von marinen Mikroalgen existieren einige verschiedene Medien. Während das ESAW-Medium in die Kategorie „künstliches Meerwasser“ fällt, gibt es auch Medien, wie beispielsweise das f/2-Medium, das filtriertes Meerwasser als Basis besitzt. Alle haben das Ziel, die bekannte Zusammensetzung des Meerwassers zu simulieren. Für die Erforschung von ökologischen Fragestellungen, ist dies meist vollkommen ausreichend. Soll allerdings eine technische Anwendung mit hohen Wachstumsraten und hohe Biomassekonzentrationen erzielt werden, so muss das Medium neu optimiert werden. Bisher wurden jedoch oft nur einzelne Makroelemente erhöht, wodurch das volle Potential nicht ausgeschöpft werden konnte.

Für die Optimierung wurden in dieser Arbeit zwei Ansätze verfolgt. In einem ersten Schritt wurde die Zusammensetzung der Biomasse gründlich untersucht. Anhand der ermittelten Zusammensetzung der funktionellen Makromoleküle konnte auf die elementare Zusammensetzung geschlossen werden. Diese ist wiederum entscheidend für die Zusammensetzung der Elemente des Kultivierungsmediums. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden in einem zweiten Ansatz gezielt die Elemente des ESAW-Mediums in ihren Konzentrationen verändert.

### **4.2.1 Makromolekulare und elementare Zusammensetzung von Mikroalgen**

Die Zusammensetzung an Proteinen, Kohlenhydraten, Lipiden und Mineralen kann zwischen unterschiedlichen Arten von Mikroalgen erheblich variieren und durch die Nährstoffverfügbarkeit sowie Kultivierungsparameter beeinflusst werden [118]. Auch innerhalb einer Spezies kann es zu Abweichungen kommen. Dies resultiert häufig durch den Auf- und Abbau von Speicherstoffen, insbesondere von Stärke und den Lipiden. Diese werden jedoch oft nicht explizit gemessen. Dazu kommt, dass einzelne Komponenten wie beispielsweise die Ribonukleinsäure (RNS) stark wachstumsabhängig sind. Tabelle 4.6 zeigt eine Zusammenfassung der makromolekularen Anteile in Prozent an der Biotrockenmasse verschiedener Mikroalgen.

Tabelle 4.6: Makromolekulare Zusammensetzung in % der Biotrockenmasse für verschiedene Mikroalgen

	<i>Chlorella vulgaris</i>				Marine Mikroalgen	
	[134]	[233]	[174]	[65]	[27]	[177]
Proteine	55	48	52	28-68	6-52	17-57
Kohlenhydrate	23	8	14	20-43	5-23	4 -37
Lipide	10	13	9	n.v.	7-23	3 -18
Pigmente	n.v.	n.v.	n.v.	2-8	n.v.	0,5-3
RNS	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
DNS	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.

n.v.: Nicht verfügbar

In den folgenden Abschnitten werden die Funktionen der einzelnen Zellkomponenten kurz beschrieben. Im letzten Abschnitt wird dann auf der Grundlage der makromolekularen Zusammensetzung der Zelle eine theoretische Berechnung zur elementaren Zellzusammensetzung durchgeführt.

### Proteine

Proteine fungieren für fast alle Reaktions- und Transportschritte im Metabolismus als Katalysatoren. Dadurch sind sie maßgeblich am Aufbau der Biomasse beteiligt [199]. Zudem ist in Mikroalgen das Chlorophyll an sogenannte Light-Harvesting-Proteine gebunden [29]. Diese sammeln die Lichtenergie, die dann in den Reaktionszentren der Photosysteme verwendet wird [29]. Diese Proteine können durch Akklimatisierung der Zellen variieren. Des Weiteren können weitere spezifische Mikroalgen-Proteine in der Elektronentransportkette der Photosynthese gefunden werden [127]. Auch die CO<sub>2</sub>-Fixierung ist von dem Protein RuBisCO (Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase) abhängig. Dabei handelt es sich vermutlich um das weltweit häufigste Protein [51].

In *Chlorella vulgaris* liegt der Proteingehalt zwischen 43 und 68 % der Biotrockenmasse [65, 145, 198, 199, 207, 210]. Etwa 20 % der Gesamtproteine werden an die Zellwand gebunden, mehr als 50 % befinden sich innerhalb der Zelle und 30 % wandern in und aus der Zelle [199]. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass der Proteingehalt in der Zelle weitestgehend konstant bleibt. Die in der Literatur gefundenen Unterschiede sind eine Folge der Akkumulation von Speicherstoffen. Diese sind fast wasserfrei und tragen dadurch zwar zum Gewicht, jedoch nicht zum Volumen der Zelle bei. Folglich ist der Gewichtsanteil relativ zu betrachten. Da die Speicherstoffe zudem keine mineralischen Anteile besitzen und dadurch nicht direkt in das Mediendesign eingreifen, kann von einer „aktiven Biomasse“ gesprochen werden [65].

Proteine bestehen aus Aminosäuren, die durch eine Peptidbindung miteinander zu Ketten verknüpft werden [139]. Tabelle 4.7 zeigt das Aminosäureprofil von *Chlorella vulgaris*. Dabei zeigt sich, dass alle essentiellen Aminosäuren vertreten sind, was Mikroalgen besonders interessant als Nahrungsergänzungsmittel beziehungsweise für den Einsatz in der Tierernährung macht [232].

Tabelle 4.7: Aminosäureprofil von *Chlorella vulgaris* (Quelle: [199], modifiziert)

Aminosäure	Anteil der Aminosäure in <i>Chlorella Vulgaris</i> (in g·100 g <sup>-1</sup> Protein)			
	[130]	[198]	[134]	[232]
Asparaginsäure	n.v.	10,1	9,8	9,9
Threonin	5,3	5,6	5,2	4,3
Serin	n.v.	7,2	4,3	5,1
Glutaminsäure	n.v.	8,4	12,7	10,6
Glycin	n.v.	7,9	6,1	5,8
Alanin	n.v.	10,1	8,3	7,6
Cystein	n.v.	0,2	1,3	1,6
Valin	7,0	2,9	6,6	6,1
Methionin	1,3	0,6	1,2	2,4
Isoleucin	3,2	0,1	4,4	4,4
Leucin	9,5	6,9	9,4	9,0
Tyrosin	n.v.	7,8	3,1	4,3
Phenylalanin	5,5	5,4	5,5	5,5
Histidin	2,0	1,2	2,0	2,1
Lysin	6,4	6,3	6,7	6,2
Arginin	6,9	6,8	6,2	6,6
Tryptophan	1,5	2,0	2,3	1,8
Ornithin	n.v.	0,1	n.v.	n.v.
Prolin	n.v.	2,7	4,9	5,3

n.v.: Nicht verfügbar

Stickstoff ist ein wichtiger Bestandteil der Aminosäuren und daher ist es eine logische Folgerung, dass ohne Stickstoff keine Proteine synthetisiert werden können [118]. Demnach ist es unerlässlich den Kultivierungsmedien eine Stickstoffquelle zuzusetzen. Dafür wird am häufigsten Nitrat, Harnstoff und Ammonium benutzt, wobei Ammonium leichter assimiliert, da es schnell in die Aminosäuren eingebaut werden kann [118, 178]. Ammonium ist zudem, im Bereich des Abwassers aus anaeroben Kläranlagen, eine der Haupt-Stickstoff-Quellen. Dadurch steigt das Interesse der Abwasserreinigung mittels Mikroalgen [71]. Bei Kultivierungen unter Stickstofflimitierungen konnte beobachtet werden, dass der relative Proteingehalt sinkt und die Zellen mehr Stärke und Lipide akkumulieren [212, 256]. So wird die Photosynthese durch N-Mangel nicht primär beeinträchtigt. Neben Stickstoff wird zudem Schwefel für die Aminosäuren Cystein und Methionin benötigt [118].

### Kohlenhydrate

Kohlenhydrate werden in die Kategorie der Struktur- und Speicherbausteine eingeordnet. Erstere sind überwiegend an dem Aufbau der Zellwand und eventuell einer Mucus-Schicht beteiligt [118]. Bei hohen Lichtintensitäten wird die überschüssige Energie in Form von Kohlenhydraten gespeichert [120, 164]. Der Gesamtkohlenhydratgehalt kann dann 12-46 % des Trockengewichtes betragen [23, 65, 199]. Stärke ist dabei das häufigste Kohlenhydrat, das in *Chlorella vulgaris* gefunden werden kann [199]. Sie befindet sich in den Chloroplasten und dient den Zellen als Energiespeicher [199].

Mikroalgen, die einen Hell-Dunkel-Zyklus durchlaufen, brauchen diese Stärkespeicher in der Dunkelpphase nahezu vollständig auf [23]. Beobachtungen legen nahe, dass die Energie für die DNS-Replikation und Kernteilung nicht aus der Photosynthese stammen, sondern aus den genannten Energiespeichern [264]. Ein klarer Beweis liefert auch diese Arbeit, die zeigt, dass eine Zellteilung ohne Licht stattfinden kann (siehe Kapitel 4.1). Zudem konnten detaillierte elektronenmikroskopische Untersuchungen von Wanka [248] zeigen, dass Stärkeablagerungen im Pyrenoid vorhanden und nicht von der Beleuchtung abhängig sind. Das Pyrenoid ist ein Chloroplasten-Mikrokompartiment, das RuBisCO beinhaltet [140]. Die Stärkeablagerungen werden auch während der Dunkelpphase gebildet und vermutlich durch den Abbau der Stärkekörner erzeugt, die sich wiederum nur bei Licht aus der überschüssigen Energie bilden können [164, 248]. Es konnte zudem beobachtet werden, dass die Stärkeablagerungen abgebaut wurden, während zeitgleich das Maximum der DNS-Synthese und der Mitose stattfand [248]. Diese Energieunabhängigkeit könnte schädliche Auswirkungen durch abrupte physiologische Veränderungen maßgeblich verringern [248].

*Emiliana huxleyi* speichert Kohlenstoff hauptsächlich in Form von niedermolekularen Verbindungen wie Mannitol, sauren Polysacchariden, Alkenonen und Lipiden [163, 229, 236].

### Lipide

Es gibt eine Vielzahl an Lipidgruppen, die von Algen synthetisiert werden können, wie beispielsweise Tri- und Diglyceriden, Phospholipiden und Glycolipiden [118]. Die Lipide erfüllen verschiedenste Aufgaben. So dienen beispielsweise Phospholipide als Membrankomponenten und Triacylglycerine (TAGs) erfüllen die Rolle als Metaboliten und Speicherprodukte [61, 118, 224]. Der Lipidgehalt in *Chlorella vulgaris* kann dann 5-40 % des Trockengewichtes ausmachen [199]. Unter ungünstigen Wachstumsbedingungen, kann er auf einem Wert von bis zu 58 % ansteigen [199, 223]. Dies bedeutet konkret, dass die Photosynthese unter günstigen Bedingungen schneller abläuft, als die Photosyntheseprodukte (Stärke) weiterverarbeitet werden können. So speichern die meisten Mikroalgen überschüssigen Kohlenstoff in Form von Kohlenhydraten während der Photosynthese. Daraus werden dann die Lipide aufgebaut. Eine Phosphatlimitierung kann ebenfalls eine Lipidakkumulation induzieren [260]. Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür lautet, dass eine Phosphatlimitierung die RNS-Synthese verhindert wodurch dann die Stärke und/oder Proteinbiosynthese unterdrückt, was zu einer Erhöhung des Kohlenstoffflusses in Richtung Lipidsynthese führt [260].

Haptophyta, wie *Emiliana huxleyi* besitzen den höchsten Lipidgehalt am Trockengewicht und sind bekannt dafür, dass sie erhebliche Lipidspeicher, insbesondere bei Nährstoffmangel, beispielsweise bei Stickstofflimitierung, bilden können [61, 88]. Dadurch verringert sich die Zelldichte und der Auftrieb wird erhöht [61]. Da die Coccolithen eine höhere Dichte als das Meerwasser aufweisen, könnte so ein Ausgleich geschaffen werden, um ein Absinken der Zellen zu verhindern.

Die Lipidproduktion in Mikroalgen kann durch Veränderung verschiedener Parameter (beispielsweise Kultivierungstemperatur, pH-Wert aber hauptsächlich durch Nährstoffungleichgewichte (siehe oben), induziert werden [35, 178]. Dadurch und auf Grund des schnellen Wachstums kommen Mikroalgen als potentielle Lieferanten für erneuerbare Biokraftstoffe in Frage [35]. Es wird

geschätzt, dass die Ölproduktivität photosynthetischer Mikroorganismen pro Fläche etwa zehnmal höher ist als die von Nutzpflanzen [211]. Da die aktuelle Biodieselproduktion hauptsächlich von Pflanzenölen und durch das Recycling von tierischen Fetten und Ölen gedeckt wird, entsteht dadurch eine Ausweitung des Ackerlandes auf Kosten des Nahrungsmittelanbaus [178]. Dieses Problem könnte durch die Verwendung von Mikroalgen umgangen werden, da sie, im Gegensatz zu terrestrischen Nutzpflanzen, keinen fruchtbaren Boden oder Ackerland für ihr Wachstum benötigen [235]. Zudem kann der Wasserbedarf recycelt beziehungsweise es kann unbegrenzt verfügbares Salzwasser verwendet werden.

### **Pigmente**

Chlorophyll (Chl) ist das häufigste Pigment in *Chlorella vulgaris* und kann 1-2 % des Trockengewichtes ausmachen [199]. Es befindet sich in den Thylakoiden als Antennenpigment wesentlich an der Photosynthese beteiligt [199, 225]. Carotinoide machen den zweitgrößten Anteil der Pigmente aus und erreichen dabei Gehalte von 0,1-0,2 % des Trockengewichtes, wobei dieser in manchen Arten sogar bis auf einen Wert von 14 % steigen kann [225]. Carotinoide können Licht in Spektralbereichen absorbieren, in denen Chlorophyll nicht mehr effektiv wirken kann [225]. Zudem besitzen sie eine schützende Wirkung, indem die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies gehemmt wird [225].

*E. huxleyi* enthält neben Chl a und den Carotinoiden zusätzlich Chl c [205]. Algen die im Meer wachsen, erfahren mehr gelbes als rotes Licht, da Letzteres vermehrt vom Wasser absorbiert wird [49]. Um dieses Licht dennoch zu nutzen, absorbiert Chl c im Wellenlängenbereich von 500-600 nm [49]. Des Weiteren ist Fucoxanthin in großen Mengen als Pigment vertreten [205]. Fucoxanthin ist ein Xanthophyll und gehört somit in die Gruppe der Carotinoide [46]. So fungiert es als Lichtsammelkomplex für die Photosynthese und besitzt ebenfalls eine schützende Wirkung für die Zellen [46]. Fucoxanthin wird eine Reihe biologischer Aktivitäten für die menschliche Gesundheit nachgesagt, wie beispielsweise eine antioxidative, entzündungshemmende, fettreduzierende, antidiabetische, krebsbekämpfend Wirkung [46]. Aufgrund dessen wird dieses Pigment intensiv erforscht [46].

### **Nukleinsäuren**

In Algen macht die Desoxyribonukleinsäure (DNS) etwa einen Anteil von 0,6-1 % der Biotrockenmasse aus [61]. Sie besteht aus Basenpaaren – Zwei Purinbasen (Adenin und Guanin) sowie zwei Pyrimidinbasen (Cytosin und Thymin). Die Basen sind über Wasserstoffbrücken miteinander verbunden und bilden somit einen Doppelstrang [126]. Dabei bildet die Reihenfolge der Basenpaare das genetische Material eines Organismus [108]. Ein Gen entspricht wiederum einem Abschnitt der DNS, der die Information zur Herstellung eines Proteins trägt [108]. Nur etwa 5 bis maximal 10 % der DNS ist für die Codierung von Proteinen verantwortlich [108]. Die DNS-Stücke zwischen den Genen besteht häufig aus repetitiven Abschnitten mit unbekannter genetischer Funktion [108].

In der RNS wird Thymin durch die Pyrimidinbase Uracil ausgetauscht [108]. Zudem handelt es sich im Vergleich zur DNS um einen Einzelstrang. Der RNS-Gehalt in Zellen ist wesentlich höher als der DNS-Gehalt [126]. So liegt er bei Mikroalgen bei 6-10 % der Biotrockenmasse [61]. Die RNS wird in sechs Klassen unterteilt: Heterogene nukleäre RNS (hnRNA), Messenger RNS

(mRNA), Transfer RNS (tRNA), Ribosomale RNS (rRNA), kleine nukleäre RNS (snRNA) und kleine cytoplasmatische RNS (scRNA) [126]. Sie alle unterscheiden sich in ihrer Funktion und ihrem Vorkommen, so kommt die nukleäre RNS beispielsweise nur im Zellkern vor [126].

#### **Elementare Zusammensetzung**

Nach Auswertung der vorherigen Paragraphen konnte anhand der Literaturwerte eine theoretische elementare Zusammensetzung einer Mikroalgenzelle berechnet werden. Als Basis der Berechnung dienten die Makromolekularen-Anteile der aktiven Biomasse, die die Arbeitsgruppe von Ortiz-Tena et al. [65, 166] ermitteln konnten. Mit Hilfe der Strukturformeln der Aminosäuren, Pigmente sowie RNS und DNS wurden die Molekulargewichte der einzelnen Monomere berechnet. Anschließend wurde der Massenanteil der einzelnen Elemente am Gewicht der polymerisierten Gesamt-Komponenten berechnet (abzüglich H<sub>2</sub>O, wegen Dehydrierung) und schließlich an der Biomasse bestimmt. Eine Übersicht der Rechnung findet sich im Anhang unter Kapitel 7.3.3.

Durch dieses Vorgehen konnte jedoch nur der Anteil an C, N, S, P und Mg an der Biomasse abgeschätzt werden, weshalb zur Vollständigkeit weitere Literaturwerte miteinbezogen wurden. So enthält das Trockengewicht der Algenbiomasse etwa 50 % Kohlenstoff [142]. Kohlenstoff bildet das Grundgerüst grundlegender Metaboliten wie Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren [118]. Nach Kohlenstoff, Wasserstoff (6,3 %) und Sauerstoff macht Stickstoff mit 1-10 % (abhängig ob ein hoher oder niedriger Lipidgehalt vorliegt) des Trockengewichtes ebenfalls einen erheblichen Anteil an der Algenzelle aus [142, 178].

Weitere Elemente können aus den Makromolekülen jedoch nicht bestimmt werden. So konnte zwar ein Magnesium-Gehalt berechnet werden, jedoch bezieht sich dieser lediglich auf den Pigmentanteil, da Magnesium das Zentralatom von Chlorophyll bildet. Magnesium fungiert jedoch beispielsweise als aktives Zentrum einiger Proteine (RuBisCo) und ist gelöst im Plasma vorhanden, wo es vermutlich im thermodynamischen Gleichgewicht mit den gebundenen Atomen steht. Die Anteile anderer Elemente müssen also aus gezielten Messungen ermittelt werden. Tabelle 4.8 zeigt eine Zusammenfassung solcher Messungen.

Tabelle 4.8: Prozentualer Anteil einiger Elemente in *Chlorella vulgaris*<sup>a</sup> und in 36 marinen Mikroalgen<sup>b</sup> (Quelle: [199, 216], modifiziert)

Element	Gehalt in g · 100 g <sup>-1</sup>			
	[134] <sup>a</sup>	[233] <sup>a</sup>	[174] <sup>a</sup>	[216] <sup>b</sup>
Na	n.v.	1,35	n.v.	7,01-32,14
K	1,13	0,05	2,15	0,72-2,09
Ca	0,16	0,59	0,27	0,47-1,82
Mg	0,36	0,34	0,44	1,41-3,72
P	n.v.	1,76	0,96	0,09-1,24
Cu	n.v.	tr	0,19	tr
Zn	n.v.	tr	0,55	n.v.
Mn	n.v.	tr	0,40	0,002-0,03
Se	n.v.	tr	n.v.	n.v.
I	n.v.	n.v.	0,13	n.v.
Fe	0,20	0,26	0,68	0,01-0,19
B	n.v.	n.v.	n.v.	0,02-0,11
Al	n.v.	n.v.	n.v.	0,001-0,04
Sr	n.v.	n.v.	n.v.	0,01-0,05
Zn	n.v.	n.v.	n.v.	tr-0,004
Pb	n.v.	n.v.	n.v.	tr-0,002
Ti	n.v.	n.v.	n.v.	tr-0,005

n.v.: Nicht verfügbar, tr: Spuren

Bei der Quantifizierung der Elemente in 36 verschiedenen marinen Mikroalgen konnten Silva et al. [216] enorme Schwankungen beobachten, obwohl in allen Versuchen die gleiche Nährmedium-Formulierung verwendet wurde. Dies liegt vermutlich an der Absorptionsfähigkeit der Algen und der Fähigkeit, Elemente aus der Umgebung zu bioakkumulieren ohne dabei das Wachstum einzuschränken [137, 216]. Auch verändert sich die Aufnahme durch einen unterschiedlichen Verbrauch der Hauptelemente und die dadurch relativ veränderte Verfügbarkeit der Spurenelemente. Somit ist folgende Abbildung 4.8 nur eine Annäherung der möglichen Zusammensetzung einer Algenzelle. Generell muss angemerkt werden, dass die genauen Bedürfnisse der Algenzellen nicht verlässlich in der Literatur beschrieben sind.

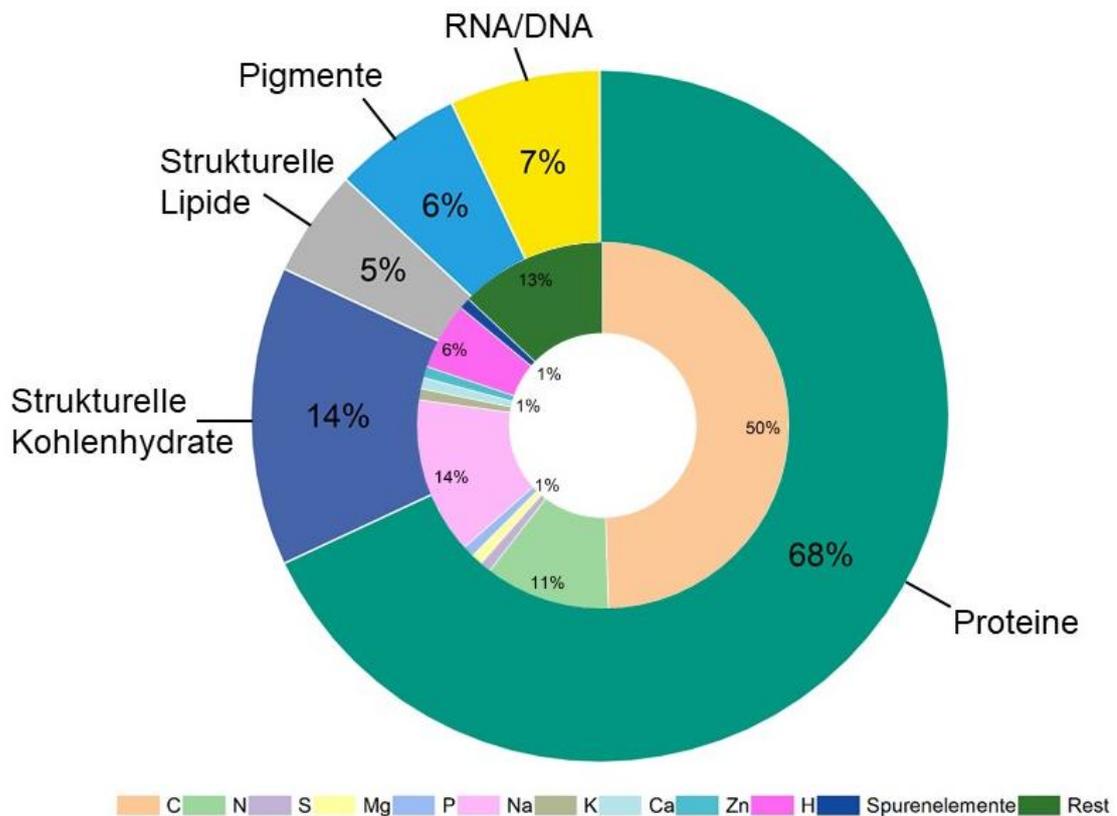


Abbildung 4.8: Geschätzte makromolekulare und elementare Zusammensetzung einer Algenzelle

Die Anteile der makromolekularen Zusammensetzung aus Abbildung 4.8 entsprechen den Werten der aktiven Biomasse von Ortiz Tena et al. [166]. Für die elementare Zusammensetzung wurde ein Kohlenstoffanteil von 50 % aus der Arbeit von Mirón et al. übernommen, ebenso wie ein Wasserstoffanteil von 6,3 %. Eigene Berechnungen führten zu einem Schwefelgehalt von 0,4 %, der durch die schwefelhaltigen Aminosäuren zustande kommt. Diese sollen auch den größten Schwefelanteil in der Zelle ausmachen [62]. Da allerdings andere Komponenten wie Sulfolipide nicht berücksichtigt wurden und Literaturwerte mit einem Schwefelanteil von 1,3 % deutlich höher angesetzt sind, wurden der berechnete und der Literaturwert gemittelt [142]. Für die Angabe des Stickstoffgehaltes wurde der Anteil an den Proteinen, der Pigmente und an der RNS sowie DNS berechnet (siehe Anhang, Kapitel 7.3.3). Für die Anteile an Magnesium und Phosphor wurden die Gehälter des jeweiligen Elementes an den Pigmenten beziehungsweise an den Nucleinsäuren berechnet und mit den Literaturwerten aus Tabelle 4.8 gemittelt. Bei den restlichen Gehalten handelt es sich um die gemittelten Werte aus Tabelle 4.8 und aus den Daten der Arbeitsgruppe von Mirón et al. [142]. In die Kategorie der Spurenelemente sind alle Elemente aus der Tabelle 4.8 und Tabelle 4.11 zusammengefasst, deren Prozentangaben so niedrig waren, dass sie die Übersichtlichkeit der Abbildung 4.8 gestört hätten. Unter dem Legendepunkt „Rest“ werden alle Elemente einbezogen, deren Zuordnung nicht möglich war.

#### 4.2.2 Optimierung des ESAW-Mediums für die Kultivierung von *Emiliana huxleyi* zur Coccolithproduktion

##### Variation der Stickstoffquelle

Stickstoff ist ein Makroelement, welches für das Wachstum aller Organismen benötigt wird [32]. Es ist nach Kohlenstoff das zweithäufigste Element in Algen und essentiell für die Biomasseproduktion [32, 114, 122, 256]. Neben der Synthese von Proteinen wird es auch für die Herstellung anderer essentieller Biomoleküle wie Chlorophylle, Enzyme, Energietransfermoleküle (ADP, ATP) und genetischem Material (DNS/RNS) benötigt [32, 132]. Algen können Stickstoff in Form von Nitrat, Nitrit und Ammonium sowie teilweise als Harnstoff aufnehmen [32]. Der Stickstoffgehalt in der aktiven Biomasse kann zwischen 5 % bis über 10 % betragen.

Die Stickstoffquelle im ESAW-Medium ist Natriumnitrat ( $\text{NaNO}_3$ ). Bei vielen Mikroorganismen und auch bei Mikroalgen stellt Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) jedoch die bevorzugte Stickstoffquelle dar [245]. Sobald es im Medium verfügbar ist, wird die Alge keine andere Stickstoffquelle verwenden, bis das gesamte Ammonium verbraucht ist [122]. Im Meerwasser ist allerdings kaum Ammonium vorhanden [222, 245]. Aus diesem Grund soll das Wachstum und die Kalzifizierung der marinen Alge *E. huxleyi* mit Ammonium als Stickstoffquelle untersucht werden. Ammonium ist technisch wesentlich besser verfügbar, weshalb es eine relevante Rolle bei einer möglichen Massenproduktion spielt. Bei der Kultivierung von Mikroorganismen mit Ammonium als einziger Stickstoffquelle zeigt sich, dass es zu einer Erniedrigung des pH-Wertes kommt, während bei der Verwendung von Nitrat der gegenteilige Effekt eintritt [182]. Eine detaillierte Beschreibung dieses Effektes findet sich in den folgenden Abschnitten.

Dieser Versuch wurde mit dem Stamm CCMP3266 in Dreifachbestimmung im Schüttelkolben (250 ml) bei einer kontinuierlichen Beleuchtung mit  $350 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-2}$  durchgeführt. Die Stickstoffkonzentration des Natriumnitrats ( $\text{NaNO}_3$ ) im ESAW-Medium (Zusammensetzung im Anhang 7.2.2 zu finden) wurde durch die äquivalente Menge an Ammoniumchlorid ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) ersetzt.

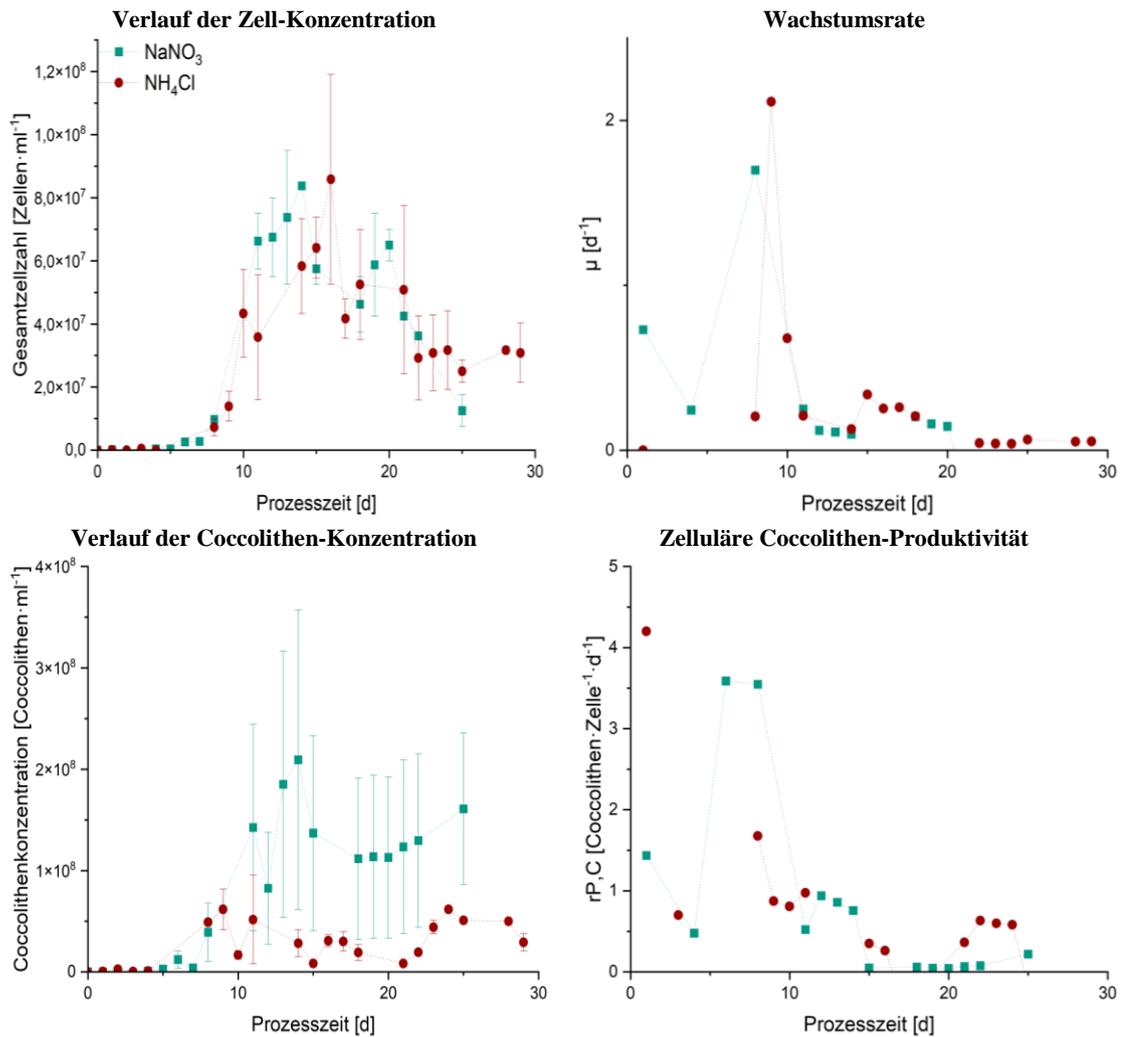


Abbildung 4.9: Links: Verlauf der Zellzahl (oben) und Coccolithen-Konzentration (unten) während der Kultivierung mit Natriumnitrat ( $\text{NaNO}_3$ ) und Ammoniumchlorid ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) als Stickstoffquelle. Rechts: Der Einfluss der Stickstoffquelle auf die Wachstumsrate (oben) und zelluläre Coccolithen-Produktivität (unten) von *E. huxleyi*

Abbildung 4.9 zeigt den Verlauf der Zell-Konzentration bei einer Kultivierung mit Natriumnitrat beziehungsweise mit Ammoniumchlorid als Stickstoffquelle. Ab Tag 5 nehmen die Zellzahlen beider Kulturen kontinuierlich zu, bis sie ihr jeweiliges Maximum erreichen. Mit  $\text{NaNO}_3$  als Stickstoffquelle wird die maximale Zell-Konzentration an Tag 14 mit einem Wert von  $8,4 \cdot 10^7$  Zellen· $\text{ml}^{-1}$  erreicht. Die gemittelte Wachstumsrate über die lineare Wachstumsphase liegt bei  $0,46 \text{ d}^{-1}$ . Die maximale Zellzahl bei einer Kultivierung mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  liegt bei  $8,6 \cdot 10^7$  Zellen· $\text{ml}^{-1}$  und wird an Tag 16 erreicht. Die gemittelte Wachstumsrate liegt bei einem Wert von  $0,56 \text{ d}^{-1}$ . Die Zellzahlen beider Versuchsreihen sinken nach Erreichen der maximalen Konzentration.

In den ersten 5 Kultivierungstagen bleibt die Coccolithen-Konzentration unverändert. Bei einer Kultivierung mit Nitrat steigt die Konzentration am darauffolgenden Tag an und erreicht an Tag 14 mit einem Wert von  $2,1 \cdot 10^8$  Coccolithen· $\text{ml}^{-1}$  das Maximum. Die zelluläre Coccolithen-Produktivität liegt bei  $1,7$  Coccolithen·Zelle $^{-1}$ · $\text{d}^{-1}$ . Bei der Kultivierung mit Ammonium steigt die Coccolithenzahl bis Tag 9. Anschließend sinkt sie bis Kultivierungstag 21 ab. Ab Tag 22 steigt

sie erneut an und erreicht schließlich an Tag 24 die maximale Coccolithen-Konzentration von  $6,2 \cdot 10^7$  Coccolithen·ml<sup>-1</sup>. Hier liegt die Coccolithen-Produktivität bei 0,8 Coccolithen·Zelle<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>.

Die erreichten Zell-Konzentrationen beider Stickstoffquellen erreichen vergleichbare maximale Werte und auch die gemittelten Wachstumsraten sind ähnlich. Dies zeigt, dass *E. huxleyi* Ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ebenfalls verstoffwechseln kann, obwohl es kein Bestandteil von Meerwasser ist [222]. Bei Chlorophyten wie *Chlorella*, *Scenedesmus* und *Dunaliella* ist bekannt, dass sie ammoniumtoleranter sind als beispielsweise *Diatomeen*, *Dinoflagellaten* und *Raphidophyten* [269]. Da das Wachstum von *E. huxleyi* mit Ammonium als Stickstoffquelle bisher kaum erforscht wurde, ist eine Einordnung der Ammoniumtoleranz schwierig. Zu hohe Ammoniumkonzentrationen können zur Wachstumshemmung und sogar zum Zelltod führen [72, 114, 122]. Ammonium kann die Synthese von Pigmenten inhibieren und auch die Photosyntheseaktivität in *C. vulgaris* beeinflussen [122]. In Versuchen von Zhao et al. [269] mit der Süßwassergrünalge *Chlorella pyrenoidosa* zeigte sich, dass das Wachstum mit steigender Ammoniumkonzentration zunahm (70 mg·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N bis 280 mg·L<sup>-1</sup>). Ab einer Konzentration von 462 mg·L<sup>-1</sup> starben die Algen innerhalb von zwei Tagen ab [269]. Ammonium liegt im Medium im Gleichgewicht mit Ammoniak. Da dieses ungehindert durch die Zellmembran diffundieren kann, könnte es zu einer mangelhaften Aufnahmeregelung kommen und damit zur Inhibition. In dieser Arbeit wurde mit 34 mg·L<sup>-1</sup> eine Ammoniumkonzentration verwendet, die weit unter den getesteten von Zhao et al. lag. Da in dieser Arbeit beide Versuchsreihen eine ähnliche Zell-Konzentration erreichten, lag vermutlich keine Inhibition des Wachstums durch Ammonium vor.

Wird die maximal erreichte Coccolithen-Konzentration beider Versuchsreihen verglichen, so zeigt sich schnell, dass die Kalzifizierung während einer Kultivierung mit Ammonium als Stickstoffquelle nicht aufrechterhalten werden konnte. Lefebvre et al. [121] kultivierten *E. huxleyi* zum einen mit Nitrat und zum anderen mit Nitrat und Ammonium. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Coccolithen in Anwesenheit von Ammonium unvollständig waren [121]. Im direkten Vergleich zeigten die Coccolithen, die ausschließlich mit Nitrat als N-Quelle kultiviert wurden, keine morphologischen Fehlbildungen [121]. Wenn der Einsatz von Ammonium dazu geführt hat, dass die Coccolithen bruchanfälliger wurden, könnte in dieser Arbeit eine verringerte Coccolithen-Konzentration bestimmt worden sein. Da während der Aufreinigung einige Male zentrifugiert werden muss (siehe Kapitel 3.5.3), könnten die Coccolithen dadurch zerstört und bei der Auszählung nicht berücksichtigt worden sein.

Jedoch konnte beobachtet werden, dass nicht nur die Coccolithenstruktur durch Ammonium beeinflusst, sondern auch die Kalzifizierungsrate verringert wird [121]. Dies wird in dieser Arbeit ebenfalls durch die verringerte zelluläre Coccolithen-Produktivität bei der Kultivierung mit Ammonium beobachtet. Wie bereits in Kapitel 4.1 beschrieben, besitzt die Kalzifizierung einen enormen Energiebedarf. Für die Aufnahme von Nitrat muss die Zelle jedoch mehr Energie aufwenden als für die Aufnahme von Ammonium. Die Nitrataufnahme erfolgt durch spezielle Transporter [230]. Nitrat wird im Cytosol dann durch die Nitratreduktase (NR) zu Nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) reduziert. Da Nitrit ein Zellgift ist muss es schnell umgesetzt werden [60]. Die Umwandlung von Nitrit erfolgt dann durch die Ferredoxin-Nitritreduktase (NiR), die ausschließlich in den Chloroplasten vorliegt, wodurch Ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) entsteht. Die Aufnahme von Ammonium verbraucht hingegen weniger Energie, da es nicht reduziert werden muss [114, 118, 132]. Während Ammoniak durch

die Zellmembran diffundieren kann, muss die Aufnahme von Ammonium durch die Ammoniumtransporter an der Plasmamembran reguliert [59, 98, 132]. Anschließend kann das Ammonium in Aminosäuren und stickstoffhaltige Metaboliten eingebaut werden [204].

Auch wenn der Energiebedarf der Stickstoffaufnahme nicht der ausschlaggebende Punkt für die geringere Coccolithenbildung ist, so könnte die Aufnahme der beiden Stickstoffverbindungen die Kalzifizierung doch anderweitig beeinflussen. So entstehen bei der Aufnahme von Nitrat überschüssige OH<sup>-</sup>-Ionen, während bei der Aufnahme von Ammonium überschüssige H<sup>+</sup>-Ionen entstehen [121, 187, 193]. Um den intrazellulären pH-Wert nicht zu versauern und um die Ladungsbilanz auszugleichen, muss das H<sup>+</sup> aus der Zelle transportiert werden [121]. Wie in Kapitel 2.2 bereits ausführlich beschrieben wurde, entsteht im Coccolithvesikel durch die Umwandlung von HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> zu CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> ebenfalls H<sup>+</sup> [5, 28, 153]. Wird dieses H<sup>+</sup> nicht entfernt, würde der pH-Wert des Coccolithvesikels sinken und eine Ausfällung von CaCO<sub>3</sub> hemmen [5]. So könnte durch die Ammoniumaufnahme ein H<sup>+</sup>-Überschuss in der Zelle vorliegen, wodurch die Kalzifizierungsrate reduziert wird.

Da die Zellen das überschüssige OH<sup>-</sup> und H<sup>+</sup> aus der Zelle schleusen, um den intrazellulären pH-Wert aufrechterhalten zu können, ändert sich der pH-Wert des Mediums bei einer Kultivierung mit Nitrat ins alkalische, während er bei Ammonium ins saure umschlägt [105, 182, 193]. Durch die CO<sub>2</sub>-Begasung während der Kultivierung kommt es jedoch ebenfalls zu einer Verringerung des pH-Wertes (siehe Gleichung 4.1, [92]), so würde eine Kultivierung mit Nitrat zwei Stellmittel benötigen, während bei einer Kultivierung mit Ammonium eines ausreichen würde.



Wie die nachfolgende Tabelle 4.9 zeigt, änderte sich der pH-Wert im Laufe der Kulturen entgegen der Erwartungen.

Tabelle 4.9: Veränderung des pH-Wertes während der Kultivierung mit NaNO<sub>3</sub> und NH<sub>4</sub>Cl

Stickstoffquelle	pH-Wert zu Beginn	pH-Wert am Ende
NaNO <sub>3</sub>	7,79	7,61
NH <sub>4</sub> Cl	8,01	7,73

Es ist zu erkennen, dass in beiden Kultivierungen der pH-Wert absinkt. Bei einer Kultivierung mit Nitrat beträgt die Abnahme 0,18 pH-Stufen, während es bei einer Kultivierung mit Ammonium 0,28 Stufen sind. Dies lässt vermuten, dass während einer Kultivierung mit Nitrat der verringere Effekt auf den pH-Wert durch CO<sub>2</sub> stärker war.

Aufgrund der komplexen Zusammensetzung des ESAW-Mediums beinhaltet es viele Komponenten, die einen Nährstoffnachweis verfälschen können. So lieferten auch die getesteten Ammonium-Nachweismethoden (Messungen mit Hilfe des Photometers und Reflektometers) keine zuverlässigen Ergebnisse. Somit kann leider keine Aussage über die aufgenommene Stickstoffmenge aus der Versuchsreihe mit Ammoniumchlorid getroffen werden.

### Variation der elementaren Zusammensetzung des ESAW-Mediums

Aufgrund der bisher niedrigen erreichten Zell- und Coccolithen-Konzentrationen sollte das ESAW-Medium für die folgenden Reaktorkultivierungen modifiziert werden. Das ESAW-Medium simuliert Meerwasser, wodurch die Nährstoffverfügbarkeit für eine möglichst hohe Endkonzentration der Biomasse und Coccolithenausbeute nicht ausreichend ist [77]. Daher wurden in den folgenden Versuchen nacheinander die Konzentrationen aller Elemente im Medium erhöht. Dabei sollten zum einen die Elemente bestimmt werden, die direkt an der Biomasse- und Coccolithenbildung beteiligt sind und zum anderen die Elemente, welche die Umgebungsbedingungen bestimmen.

Die Versuche wurden jeweils in Dreifachbestimmung im Schüttelkolben (250 ml) mit dem Stamm CCMP3266 durchgeführt. Bei jedem Ansatz wurden mehrere Modifikationen gleichzeitig getestet. So wurden beispielsweise in Ansatz 1 drei Konzentrationserhöhungen (25-, 50- und 100-fach) an Stickstoff, Phosphor, den Spurenelementen (enthalten unter anderem Zn, Co, Mn, Ni und andere) und Vitaminen parallel getestet. Aufgrund der Menge an Daten werden in den folgenden Kapiteln aus jeder Versuchsreihe nur die Kurvenverläufe mit den besten Ergebnissen dargestellt. Die ausführlichen Diagramme sowie eine Tabelle in der alle Konzentrationsveränderungen dargestellt sind, befinden sich im Anhang (Kapitel 7.2.2, Tabelle 7.5 sowie Kapitel 7.3.3, Abbildung 7.12-Abbildung 7.17). Die folgende Tabelle 4.10 gibt eine Zusammenfassung der Modifikationsansätze. Dabei wird der Ansatz mit einer Nummer bezeichnet, der auch in der grafischen Darstellung äquivalent eingesetzt wird. Des Weiteren wird die Veränderung des Mediums aufgeführt, sowie die Versuchsreihe, die in Abbildung 4.10 dargestellt wird. Stocklösungen, die in dem Ansatz nicht aufgelistet sind, wurden in der ESAW-Konzentration zugesetzt.

Tabelle 4.10: Überblick der verschiedenen Versuchsansätze zur Optimierung des ESAW-Mediums

<b>Ansatz</b>	<b>Veränderung</b>	<b>In Abbildung 4.10 dargestellt</b>
0	Unverändertes ESAW-Medium	
1	Erhöhung der Konzentration an Stickstoff, Phosphor, den Spurenelementen und der Vitamine	25x Stickstoff-, Phosphor-, Spurenelement- und Vitamin-konzentration
2	Reduktion der Spurenelemente	25x Stickstoff-, Phosphor- und Vitamin-Konzentration, 5x Spurenelement-Konzentration
3	Erhöhung der Vitaminkonzentration	25x Stickstoff-, Phosphor- und Spurenelement-Konzentration, 50x Vitamin-Konzentration
4	Erhöhung der Eisenkonzentration	25x Stickstoff-, Phosphor- und Spurenelement-Konzentration, 50x Vitamin-Konzentration, 5x Eisen-Konzentration
5	Erhöhung der Siliziumkonzentration	25x Stickstoff-, Phosphor- und Spurenelement-Konzentration, 50x Vitamin-Konzentration, 1x Eisen-Konzentration, 12,5x Silikat-Konzentration
6	Erhöhung aller Elemente der Salzlösung I und II	25x Stickstoff-, Phosphor- und Spurenelement-Konzentration, 50x Vitamin-Konzentration, 1x Eisen-Konzentration, 12,5x Silikat-Konzentration, 2x Salzlösung I und II (mit Ausnahme von NaCl)

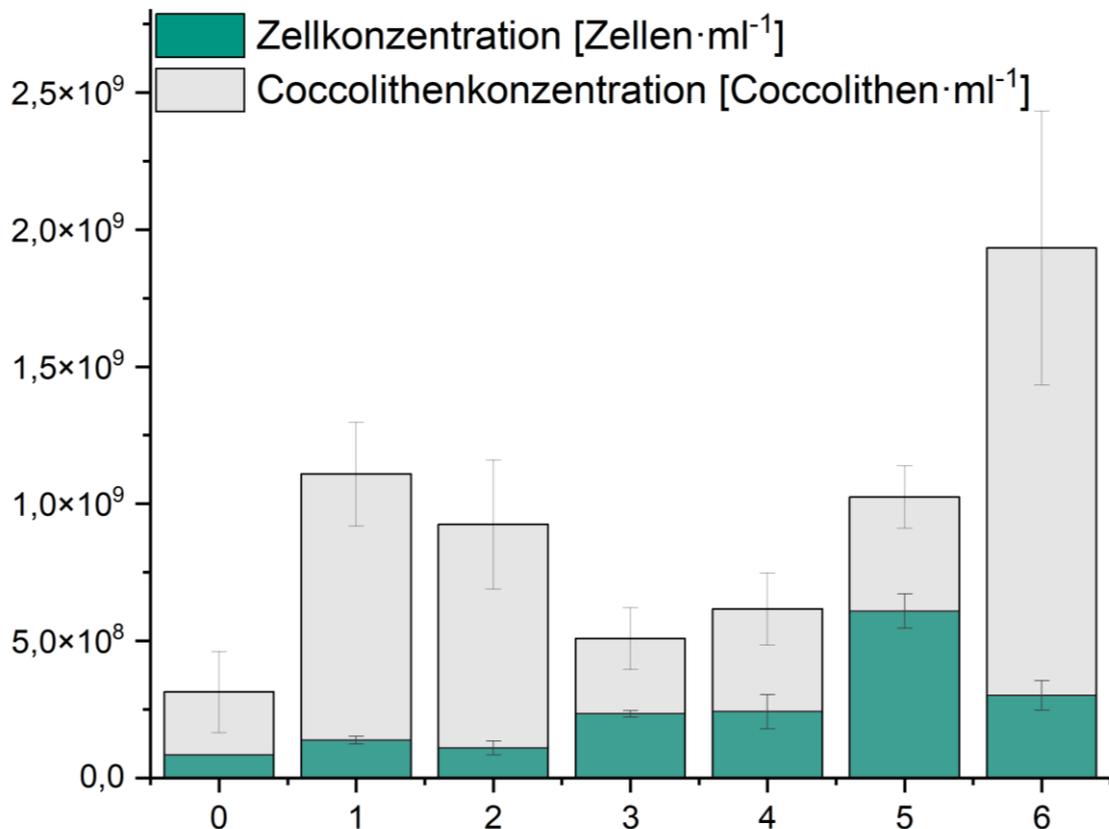


Abbildung 4.10: Darstellung der höchsten Zell- und Coccolithen-Konzentrationen der sechs Modifikationsansätze des ESAW-Mediums zur Wachstums- und Kalzifizierungsoptimierung

Abbildung 4.10 zeigt die maximal erreichten Zell- (grün) und Coccolithen-Konzentrationen (grau). In keiner der getesteten Versuchsansätze kam es zu einer Limitierung an Stickstoff, Phosphor oder Calcium (siehe Kapitel 7.3.3, Tabelle 7.16).

Bei der Verwendung des unveränderten ESAW-Mediums werden Zell-Konzentrationen von  $8,4 \cdot 10^7$  Zellen·ml<sup>-1</sup> erreicht. Von allen Versuchsansätzen ist dies die niedrigste erreichte Zellzahl. Auch der Wert der Coccolithen-Konzentration ist mit  $3,1 \cdot 10^8$  Coccolithen·ml<sup>-1</sup> der geringste.

#### **Erhöhung der Konzentrationen an Phosphat, Nitrat, den Spurenelementen und Vitaminen**

Durch die 25-fache Erhöhung der Phosphor-, Stickstoff-, Spurenelement- und Vitamin-Konzentration kann die maximale erreichte Zell-Konzentration auf  $1,4 \cdot 10^8$  Zellen·ml<sup>-1</sup> erhöht werden. Auch die Kalzifizierung scheint positiv stimuliert zu werden. So steigt die Coccolithen-Konzentration auf  $1,1 \cdot 10^9$  Coccolithen·ml<sup>-1</sup> an.

Stickstoff ist notwendig für die Biomassenbildung und besitzt dadurch als logische Konsequenz einen positiven Einfluss auf das Wachstum von Mikroalgen [178]. In Versuchen mit der Grünalge *Chlorella vulgaris* konnte gezeigt werden, dass je niedriger die Nitratkonzentration in dem Kultivierungsmedium war, desto früher erreichte die Kultur die stationäre Phase [256]. Auch die Wachstumsrate wird durch die verfügbaren Nitratkonzentrationen beeinflusst. So beobachtete die

Arbeitsgruppe von Feng et al. [57], dass die Wachstumsrate mit steigender Nitratkonzentration (3,7-50  $\mu\text{M}$ ) zunahm (0,1-0,8  $\text{d}^{-1}$ ). So zeigte sich auch in dieser Arbeit eine Erhöhung der gemittelten Wachstumsrate in der exponentiellen Wachstumsphase. Bei der Verwendung des unveränderten ESAW-Mediums wurde eine Rate von 0,5  $\text{d}^{-1}$  erreicht, während sie bei dem Modifikationsansatz 1 bei 0,8  $\text{d}^{-1}$  lag.

Auch Phosphor besitzt einen enormen Einfluss auf das Wachstum. Es ist ein essentieller Makronährstoff für alle lebenden Zellen und macht etwa 1 % der durchschnittlichen Mikrobe aus [16]. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Energiespeicherung und wird in der Zelle beispielsweise in Form von ATP oder Polyphosphaten gefunden [16]. Auf den ersten Blick kommt Phosphor relativ häufig vor, da es das häufigste Element im Universum ist, die Häufigkeit in der Erdkruste ist jedoch gering [52]. In Gewässern liegt es hauptsächlich als Phosphat vor [62]. Es wird vermutet, dass Algen Phosphor bevorzugt als Orthophosphat aufnehmen, dessen Verfügbarkeit über den pH-Wert reguliert wird [62, 193]. Wird während einer Kultivierung der Phosphor aus dem Medium aufgebraucht, sinken die Wachstumsraten augenblicklich ab und es kommt zu einem Stillstand der Zellteilung [169]. Eine Erhöhung der Phosphatkonzentration im Medium (0,5-20  $\mu\text{M}$ ) führt jedoch nicht zu einer Steigerung der Wachstumsrate, diese bleibt über den gesamten Konzentrationsbereich konstant [57]. Dies bedeutet im Umkehrschluss auch, dass das Wachstum von *E. huxleyi* bei niedrigen Phosphatkonzentrationen nicht negativ beeinflusst wird. So gelten niedrige Phosphatkonzentrationen sogar als ein Auslöser für die Algen-Blüten von *E. huxleyi*. Im Golf von Maine wurden, an einer Messstation innerhalb der Blüte, niedrigere Phosphatkonzentrationen (0,02-0,16  $\mu\text{M}$ ) gemessen als an einer Station außerhalb der Blüte (0,21-0,49  $\mu\text{M}$ ) [234]. In der Nordsee konnte durch Van der Wal et al. [242] ebenfalls eine geringere Phosphatkonzentration beobachtet werden (0,1  $\mu\text{M}$  im Vergleich zu 0,3  $\mu\text{M}$ ). Diese niedrigen Konzentrationen schienen das Wachstum von *E. huxleyi* jedoch nicht zu limitieren. Dies könnte daran liegen, dass die Alge das Enzym „alkalische Phosphatase“ synthetisieren kann [113, 195]. Dadurch können Phosphatgruppen von gelösten organischen Molekülen entfernt werden, wodurch die Alge einen Vorteil gegenüber anderen Mikroorganismen besitzt, deren Wachstum bei einem Mangel an anorganisches Phosphat begrenzt ist [238].

Der Einfluss von Stickstoff und Phosphor auf die Kalzifizierung ist umstritten. So beobachteten Feng et al. [57] durch die Erhöhung der Nitratkonzentration eine Zunahme der Kalzifizierungsrate. Bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  Nitrat erreichte sie das Maximum der Rate mit einem Wert von etwa 0,5  $\text{pg C}\cdot\text{Zelle}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ . Bei einer weiteren Steigerung der Nitratkonzentration blieb die Kalzifizierungsrate konstant [57]. Begründet wurde diese Beobachtung damit, dass Stickstoff bedeutsam für die Nukleinsäure- und Proteinbiosynthese ist. Eine Erhöhung der Nitratkonzentration könnte die Herstellung von Proteinen gefördert haben, die als wichtige Transporter bei der Kalzifizierung fungieren, wodurch eine höhere Coccolithen-Konzentration erreicht werden kann [57, 188]. Weiterhin ist Stickstoff das Element für die Synthese der organischen Matrixmaterialien der Coccolithen, weshalb eine Stickstofferhöhung in diesem Versuch zu einer Erhöhung der Coccolithen-Konzentration um 353 % geführt haben könnte [57, 160, 206]. Bei einer Erhöhung der Phosphorkonzentrationen blieb die Kalzifizierungsrate jedoch konstant [57].

Gegen diese Beobachtungen sprechen jedoch die Versuche von Paasche [169]. Diese zeigten, dass die Anzahl der neu produzierten Coccolithen pro Zelle, in P- und N-limitierten Medium, von  $34\pm 36$  auf  $100\pm 120$  anstieg [169]. In der P-limitierten Kultur war die Mehrzahl der Coccolithen

überverkalkt, während eine N-Limitierung zu einer Unterverkalkung führte [169]. Einer N-Limitierung führte zudem zu einem Rückgang des Calciumgehaltes der Coccolithen um 20 %, während eine P-Limitierung zu einem Anstieg von 15 % führte [169]. Diese Ergebnisse werden in den Versuchen von Linschooten et al. [125] bestätigt. Sie zeigten, dass eine Nitrat- und Phosphat-limitierung zu einer Zellgeneration führte, die mehrere Coccolithenschichten besaß. Eine erhöhte Coccolithenproduktion bei Nährstoffmangel könnte für die Zellen den Vorteil haben, dass sie im Ozean schneller absinken und so in tiefere, nährstoffreichere Gewässer gelangen würden [125]. Dieser Effekt muss jedoch nicht ausschließen, dass die Kalzifizierung bei einem Überschuss an Stickstoff und Phosphor ebenfalls positiv beeinflusst wird.

### Erniedrigung der Spurenelementkonzentration

Da in den Versuchen aus Ansatz 1 beobachtet werden konnte, dass ab einer 50-fachen Erhöhung der Phosphat-, Nitrat, Spurenelement- und Vitaminkonzentration das Wachstum stark eingeschränkt wurde, wurde in Ansatz 2 der Anteil an den Spurenelementen reduziert. So sind Spurenelemente für das Wachstum essentiell, wirken aber in zu hohen Konzentrationen toxisch [37].

Bei der Verwendung einer 25-fachen Konzentration an Phosphat, Nitrat und den Vitaminen sowie einer 5-fachen Konzentration der Spurenelemente, wurde eine maximale Zell-Konzentration von  $1,1 \cdot 10^8$  Zellen·ml<sup>-1</sup> erreicht. Die Coccolithen-Konzentration erreicht einen maximalen Wert von  $9,1 \cdot 10^8$  Coccolithen·ml<sup>-1</sup>. Im Vergleich zu der ersten Modifikation sind jedoch die Zell- und vor allem die Coccolithen-Konzentrationen geringer. Auch ist die gemittelte Wachstumsrate mit einem Wert von 0,3 d<sup>-1</sup> im Vergleich zu 0,8 d<sup>-1</sup> deutlich niedriger. Dies lässt darauf schließen, dass es zu einer Limitierung eines Elementes kam, das sich in der Spurenelement-Stocklösung befand (siehe Tabelle 7.2).

In dieser Stocklösung befinden sich sechs verschiedene Elemente, somit ist eine gezielte Aussage, welches Element limitierend gewirkt haben könnte, schwierig. Tabelle 4.11 gibt einen Überblick der Spurenelementzusammensetzung vier verschiedener Mikroalgen. Diese beinhaltet drei der sechs Elemente und gibt keine Angaben über die Konzentrationen an Co, Mo und Ni.

Tabelle 4.11: Spurenelementzusammensetzung verschiedener Mikroalgen (mg pro kg Trockenmasse) [232]

	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Micractinium reisseri</i>	<i>Nannochloris bacillaris</i>	<i>Tetracystis sp.</i>
Mangan	34,6 ± 0,6	32,0 ± 0,5	17,4 ± 0,4	19,4 ± 0,5
Selen	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,2	n.v.	0,6 ± 0,2
Zink	25,4 ± 0,3	11,5 ± 0,3	10,9 ± 0,2	11,0 ± 0,4

n.v.: Nicht verfügbar

Dabei ist zu erkennen, dass Mangan den größten Anteil der drei Spurenelemente ausmacht. Mangan wird für die Photosynthese benötigt und dient dort als Metalloenzym [218]. Es ist ein Cofaktor des Photosystem II und Bestandteil des Sauerstoff entwickelnden Prozesses [218]. Es fungiert zudem als Cofaktor in enzymatischen Antioxidanten [218]. Im ersten Modifikationsansatz waren im Medium 3,0 mg·L<sup>-1</sup> an Mangan vorhanden. In diesem Versuchsansatz sind es lediglich

0,6 mg·L<sup>-1</sup>. Mangan ist laut den Ergebnissen von Jakob et al. [93] zudem das einzige Element der Spurenelementlösung, das in den Coccolithen vertreten ist. Dadurch wird der Verdacht einer Manganlimitierung verstärkt und könnte den enormen Rückgang der Coccolithen-Konzentration im Vergleich zum ersten Modifikationsansatz erklären.

Neben Mangan sind noch einige andere Elemente mit wichtigen Funktionen in der Spurenelementlösung vorhanden. So wird für die Stickstofffixierung beispielsweise Molybdän benötigt. Aufgrund der Fähigkeit Valenzzustände zu verändern, spielt es eine große Rolle bei Redoxreaktionen [62]. Cobalt ist hingegen für die Vitamin B12-Produktion unentbehrlich [193]. Doch Spurenelemente bringen häufig unvorhersehbare Probleme für die Kultivierung mit sich. So neigen sie dazu, sich mit anderen Bestandteilen des Mediums zu verbinden, was zur Ausfällung führt. Dadurch stehen die gebundenen Elemente nicht mehr zur Verfügung [193]. Die Zugabe von Metallchelatoren wie EDTA können dieses Problem verringern [193]. Zum anderen können sich Schwermetalle an funktionelle Gruppen auf der Zelloberfläche binden [137]. In den Versuchen von Maznah et al. [137] aggregierten die Zellen daraufhin. Dies wird vermutlich durch die Sekretion von Polysacchariden als Reaktion auf die gebundenen Schwermetalle induziert [137]. Diese Polysaccharide besitzen Hydroxyl-, Sulfat- und Carboxylgruppen, die als starke Ionenaustauscher wirken und somit Komplexierungsstellen für Metallkationen darstellen [267].

Wie im Anhang unter Kapitel 7.3.3, Abbildung 7.13 gezeigt ist, konnte in dieser Versuchsreihe auch bei einer 50-fachen Erhöhung an Nitrat, Phosphat und den Vitaminen ein Zellwachstum beobachtet werden. Dieses verlief jedoch langsamer und auch die maximal erreichten Zell- und Coccolithen-Konzentrationen waren niedriger als bei einer 25-fachen Konzentration. Aufgrund dieses Ergebnisses lässt sich jedoch vermuten, dass im ersten Modifikationsansatz tatsächlich der toxische Einfluss der Spurenelemente das Wachstum begrenzt hat.

#### **Erhöhung der Vitaminkonzentration**

Die Zell- und Coccolithen-Konzentration war im ersten Modifikationsansatz höher als im zweiten. Daher wurde für die weitere Optimierung des Mediums eine 25-fache Konzentration an Phosphat, Nitrat und den Spurenelementen gewählt und mit der 50-fachen Konzentrationen an Vitaminen versehen. Dieser Ansatz führte zu einer maximalen Zellzahl von  $2,3 \cdot 10^8$  Zellen·ml<sup>-1</sup> und einer Coccolithen-Konzentration von  $5,1 \cdot 10^8$  Coccolithen·ml<sup>-1</sup>. Im Vergleich zum ersten Modifikationsansatz zeigt sich somit, dass die Zellzahl deutlich höher, die Coccolithen-Konzentration jedoch fast um den Faktor 5 geringer ist.

In der Vitaminlösung des ESAW-Mediums sind drei Vitamine vertreten: Thiamin, Biotin und Cobalamin. Thiamin wird von der Zelle zu dem Coenzym Thiamindiphosphat umgewandelt, welches an der Acetyl-Coenzym-A-Synthese beteiligt ist und darüber Einfluss auf den Citratzyklus ausüben kann [97, 139]. Biotin ist ein Coenzym für viele Carboxylierungsreaktionen und scheint im Zellkern an der Genregulation beteiligt zu sein [78, 126]. Cobalamin wird für die Durchführung des Folat-Zyklus benötigt, welcher wiederum eine wichtige Rolle für die DNS-Synthese spielt [259]. Somit können zwei der drei eingesetzten Vitamine mit dem Zellzyklus in Verbindung gebracht werden, wodurch das Wachstum der Kultur positiv stimuliert werden könnte.

Des Weiteren sind Algen dazu befähigt mit Hilfe von periplasmatischen Aminosäureoxidasen Aminosäuren zu desaminieren, wodurch Ammonium entsteht [114]. Vitamine sind keine Aminosäuren. Jedoch beinhalten Thiamin sowie Cobalamin eine Aminogruppe (-NH<sub>2</sub>). So könnte auch hier durch eine Desaminierung die Aminogruppe abgespalten werden, wodurch Ammonium entsteht. Wie bereits ausführlich beschrieben wurde, gilt Ammonium als bevorzugte Stickstoffquelle [245]. Zudem wird keine andere Stickstoffquelle verwendet, bis das gesamte Ammonium aus dem Medium verbraucht wurde [122]. Im Falle von Nitrat als zweite Stickstoffquelle wurde beobachtet, dass die Nitrataufnahme stark reduziert wurde, sobald Ammonium für die Zelle vorhanden war [121, 245]. Bei *E. huxleyi* zeigte sich, dass eine Ammoniumkonzentration von 0,2 µM bereits die Nitrataufnahme halbiert und eine Konzentration von 2,2 µM die Aufnahme vollständig hemmt [245]. In diesem Modifikationsansatz wäre die Ammoniumkonzentration durch eine Desaminierung der Vitamine deutlich geringer (~ 0,01 µM). Somit wäre der hemmende Effekt des Ammoniums auf die Nitrataufnahme geringer als in der Arbeit von Varela und Harrison [245]. Dies wird durch die eigenen Ergebnisse dieser Arbeit gestützt. In den Versuchen mit dem Austausch der Stickstoffquelle ist zu sehen, dass die Kalzifizierung mit Ammonium als alleinige Stickstoffquelle stark eingebrochen ist. In dieser Versuchsreihe sank die Coccolithen-Konzentration im Vergleich zum ersten Modifikationsansatz zwar ebenfalls erheblich ab, jedoch war dieser Abfall nicht so signifikant wie in den Versuchen mit Ammonium als Stickstoffquelle.

### **Erhöhung der Eisenkonzentration**

Aufgrund des enormen Anstiegs der Zell-Konzentration im dritten Modifikationsansatz wurde das ESAW-Medium für die vierte Modifikation mit der 25-fachen Konzentration an Phosphat, Nitrat und Spurenelementen sowie der 50-fachen Konzentration an den Vitaminen versehen. Wurde darüber hinaus die Eisenkonzentration verfünffacht, so konnte eine maximale Zellzahl von  $2,4 \cdot 10^8$  Zellen·ml<sup>-1</sup> erreicht werden. Die Coccolithen-Konzentration betrug  $6,2 \cdot 10^8$  Coccolithen·ml<sup>-1</sup>.

Eisen ist ein essentieller Mikronährstoff für alle aeroben Organismen [68]. In Gewässern liegt es in seinen zwei Oxidationsstufen Fe<sup>2+</sup> und Fe<sup>3+</sup> vor [62]. Dort liegt Fe<sup>3+</sup> gebunden an Salzen am häufigsten vor [62]. Eisen ist Bestandteil vieler Proteine, die am Energiestoffwechsel beteiligt sind [68]. Zusammen mit Schwefel kann Eisen Fe-S-Gruppen sowie Ferrosulfatproteine bilden [68]. Diese Eisen-Schwefel-Proteine dienen als anorganische Cofaktoren, die in Proteinen bei verschiedenen Stoffwechselwegen, wie der Photosynthese und der Atmung beteiligt sind [68]. Zudem finden sie Einsatz bei der Regulation der Genexpression, der Proteintranslation und bei Stoffwechselwegen im Zusammenhang mit der Assimilation von Stickstoff [8, 68, 124]. So benötigt die Nitritreduktase zwei Cofaktoren: Ein (4Fe-4S)-Eisen-Schwefel-Cluster und ein Sirohäm. Eisen-Schwefel-Cluster wirken in Enzymen als Elektronentransferreaktanden. Aerobe eukaryotische Organismen stellen die Fe-S-Gruppen in den Mitochondrien her, während photosynthetische aerobe Organismen diese in den Chloroplasten synthetisieren [9, 68]. Das Sirohäm besitzt ein zentrales Eisenatom und wird für die sechs-Elektronenreduktion von Nitrit zu Ammonium benötigt. Die beiden Cofaktoren bilden eine Elektronentransportkette und übertragen Elektronen vom Elektronendonator Ferredoxin auf das Nitrit. Für eine vollständige Reduktion von Nitrit müssen sechs Elektronen übertragen werden [204]. Durch eine Erhöhung der Eisenkonzentration in diesem Modifikationsansatz konnte die Zellzahl geringfügig gesteigert werden. Die Ei-

senkonzentrationen im Ozean sind sehr gering [19]. Dadurch hat *E. huxleyi* das Wachstum vermutlich an die limitierenden Bedingungen angepasst, wodurch keine signifikante Verbesserung durch eine Erhöhung der Eisenkonzentration herbeigeführt werden konnte.

Bei einer weiteren Steigerung der Eisen-Konzentration auf das 25-fache der Ausgangskonzentration konnte beobachtet werden, dass die Zellzahl deutlich geringer ausfiel (siehe Anhang Kapitel 7.3.3, Abbildung 7.15). Eisen wirkt in zu hohen Konzentrationen toxisch und verursacht oxidativen Stress sowie Schäden an zellulären Makromolekülen [68]. Des Weiteren kann Eisen mit Phosphor Komplexe bilden, wodurch beide Elemente nicht mehr bioverfügbar sind [35]. Ein Phosphormangel würde, wie bereits beschrieben, das Wachstum stark negativ beeinflussen. Da die Eisenkonzentrationen im Ozean sehr niedrig sind, führte dies vermutlich dazu, dass marine Mikroorganismen keine Regulationsmöglichkeiten für die Eisenaufnahme entwickelt haben [19]. Durch solch eine ungehemmte Eisenaufnahme kann es in der Zelle dann zur Bildung von Hydroxyl-Radikalen durch die Fenton-Reaktion kommen [73]. Diese Hydroxyl-Radikale sind sehr reaktiv und können enormen Schaden in der Zelle anrichten. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass in den Kolben dieser Versuchsreihe enorme Zellaggregate gefunden wurden, wodurch die tatsächliche Zellzahl stark verfälscht wurde (siehe Abbildung 7.18).

Die Coccolithen-Konzentration wurde im Vergleich zur dritten Modifikationsansatz ebenfalls nur geringfügig gesteigert. Da Eisen ein Bestandteil der Coccolithen ist (etwa 0,15 %), könnte eine höhere Verfügbarkeit zu einer verbesserten Kalzifizierung geführt haben [93]. Wird die erreichte Coccolithen-Konzentration der Versuchsreihe mit einer 25-fachen Eisenkonzentration mit einbezogen, so scheint dieser stimulierende Effekt auf die Coccolithen noch ausgeprägter zu sein (siehe Kapitel 7.3.3, Abbildung 7.15). Dabei wurde mit einem maximalen Wert von  $5,4 \cdot 10^8$  Coccolithen- $\text{ml}^{-1}$  fast dieselbe Konzentration erreicht, wie bei der Verwendung der 5-fachen Eisenkonzentration, obwohl die maximale Zellzahl deutlich geringer war. Jakob et al. [94] konnten in ihren Versuchen beobachten, dass eine Verringerung der Eisenkonzentration zu unterkalzifizierten Coccolithen führte, während eine Erhöhung den gegenteiligen Effekt bewirkte. Dieser Effekt könnte eine Reaktion von *E. huxleyi* auf die Toxizität des Eisens sein. So konnte beobachtet werden, dass bei einer Erhöhung des Zink/Calcium-Verhältnisses im Kultivierungsmedium auch das Zink/Calcium-Verhältnis in den Coccolithen zunahm [202]. Dies lässt vermuten, dass der erhöhte Einsatz von Eisen im Medium denselben Effekt mit sich bringt. Die Coccolithen könnten durch Steigerung des Schwermetallanteils zur Entgiftung der Zelle beitragen [202].

#### **Erhöhung der Siliziumkonzentration**

Da eine Erhöhung der Eisenkonzentration keine merkliche Verbesserung der Zell- und Coccolithen-Konzentration herbeiführte, die negativen Aspekte wie Zellaggregation und Komplexbildung mit anderen Elementen jedoch überwogen, wurde für die weitere Modifikation des ESAW-Mediums auf eine Erhöhung der Eisenkonzentration verzichtet. Somit wurde die 25-fache Konzentration an Phosphat, Nitrat und Spurenelementen, die 50-fache Konzentration der Vitamine und eine 2,5- beziehungsweise 12,5-fache Konzentration an Silizium verwendet (siehe Kapitel 7.3.3, Abbildung 7.16).

Durch die Erhöhung der Siliziumkonzentration um das 12,5-fache konnte eine maximale Zellkonzentration von  $6,1 \cdot 10^8$  Zellen·ml<sup>-1</sup> erzielt werden. Die Coccolithen-Konzentration erreichte einen Wert von  $1,0 \cdot 10^9$  Coccolithen·ml<sup>-1</sup>.

In Feldversuchen wurde beobachtet, dass die Si-Konzentration während der Algenblüte von *E. huxleyi* gering war (etwa 0,46 µM) [215]. Dies führte schnell zu der Annahme, dass Coccolithophoriden Si-armes Gewässer als biologische Nische gegenüber den Kieselalgen nutzen würden [50, 85]. Für Kieselalgen ist Silizium ein essentieller Nährstoff, da sie Silikat für ihre Zellwände benötigen [112]. Die Kalzifizierung der Coccolithophoren entwickelte sich zu einer Zeit, in der die Siliziumkonzentrationen im Ozean deutlich höher waren als heute [229]. Erst durch die folgende Ausbreitung der Kieselalgen sanken die Konzentrationen ab [118, 213, 229].

Kieselalgen nehmen Silizium durch hochaffine Na<sup>+</sup>-gekoppelte Si-Transporter (SITs) in ihrer Plasmamembran auf [229]. Solche Transporter wurden auch in der Coccolithophore *Scyphosphaera apsteinii* gefunden sowie SIT-ähnliche Proteine in drei weiteren Coccolithophoren [50]. Bei der Verwendung des Si-Analogen Ge, der als kompetitiver Inhibitor der Si-Aufnahme wirkt und einer geringen Siliziumkonzentration im Medium, produzierten die Zellen stark abweichende Coccolithen [50]. Dies lässt die Vermutung zu, dass Silizium für die Kalzifizierung dieser Coccolithophoriden notwendig ist [50, 229]. Die Untersuchungen zeigten jedoch auch, dass *E. huxleyi* keine SITs oder SIT-ähnliche Proteine besitzt [50, 229]. Interessanterweise konnten die Untersuchungen von Jakob et al. [93] an *E. huxleyi* jedoch zeigen, dass Silizium mit 6,6 % einen erheblichen Anteil der Coccolithen ausmacht. Auch in den Coccolithen anderer Coccolithophoren konnte Silizium als Bestandteil ausgemacht werden [18]. Eine Verringerung der Siliziumkonzentration im Kultivierungsmedium führte zudem dazu, dass die Coccolithen von *E. huxleyi* Fehlbildungen aufwiesen und fragiler waren [95]. Dies bedeutet jedoch, dass *E. huxleyi* eine alternative Möglichkeit zur Siliziumaufnahme besitzen muss. Kieselalgen können bei hohen Siliziumkonzentrationen die Aufnahme auch über diffusiven Transport ins Zellinnere stattfinden lassen [231]. So wäre vorstellbar, dass diese Möglichkeit auch bei *E. huxleyi* vorzufinden ist.

Bei der Verwendung der 25-fachen Siliziumkonzentration würde auf Grund der Coccolithen-Konzentration eine theoretische Coccolithenmasse von 2,5 g·L<sup>-1</sup> erreicht werden. Wird davon ausgegangen, dass die Coccolithen zu 86 % aus Calciumcarbonat bestehen, würde ein Bedarf von 861 mg Calcium·L<sup>-1</sup> vorliegen [93]. Allerdings wurden während der Kultivierung lediglich 277 mg·L<sup>-1</sup> verbraucht. Wie bereits im vorherigen Kapitel beschrieben wurde, konnte durch Erhöhung des Zink/Calcium-Verhältnis im Medium auch ein erhöhtes Zink/Calcium-Verhältnis in den Coccolithen beobachtet werden [202]. Dieser Effekt zeigte sich auch bei der Verwendung von Strontium und Barium [116, 117, 150]. Auch wenn in dieser Versuchsreihe die Calciumkonzentration nicht erhöht wurde, kann auf Grund der Ergebnisse vermutet werden, dass der Siliziumanteil an den Coccolithen durch die gesteigerte Verfügbarkeit zugenommen haben könnte.

Die erreichte Zell-Konzentration in diesem fünften Modifikationsansatz ist um das 2,5-fache höher als die Zellzahl, die bei der vierten Modifikation erreicht wurde. Der Einfluss von Silizium auf das Wachstum ist nicht bekannt, dennoch enthalten 0,2 % der Biotrockenmasse der Coccolithophore *Syracosphaera carterae* Silizium [177]. Bei einer theoretisch erreichten neu produzierten Biomassekonzentration von 352 mg·L<sup>-1</sup> würde die Kultur somit einen Siliziumbedarf von lediglich etwa 0,07 mg·L<sup>-1</sup> besitzen (Berechnung mit den Werten aus Tabelle 7.16). Da durch die

Konzentrationserhöhung im Medium  $32 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Silizium vorliegen, wird der Bedarf für das Wachstum vollständig gedeckt (siehe Tabelle 7.5). Während der Kultivierung von *E. huxleyi* durch Jakob et al. [95] konnte durch die Verringerung der Siliziumkonzentrationen keine negative Auswirkung auf das Wachstum beobachtet werden. Dort betrug die Siliziumkonzentration jedoch noch immer  $0,3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  und die erreichte Zell-Konzentration war mit etwa  $10^7 \text{ Zellen}\cdot\text{ml}^{-1}$  deutlich geringer, sodass die verfügbare Siliziummenge das Wachstum vermutlich nicht beschränkt hat.

Neben Calcium sind noch einige weitere Elemente Bestandteil der Coccolithen, wie beispielsweise Magnesium [93]. Wenn die Vermutung, dass der Siliziumanteil der Coccolithen erhöht werden kann zutreffend wäre, so könnte dies dazu führen, dass der Anteil anderer Elemente reduziert werden könnte. Durch eine erhöhte Verfügbarkeit von Magnesium könnte das Wachstum positiv beeinflusst werden, da es als Zentralatom von Chlorophyll eine enorme Rolle bei der Photosynthese spielt.

### **Erhöhung der Elemente in den Salzlösungen**

Aufgrund des positiven Wachstums aus dem fünften Modifikationsansatz wurde für den letzten Optimierungsversuch eine 25-fache Konzentration an Phosphat, Nitrat und Spurenelementen, eine 50-fache Konzentration der Vitamine sowie eine 12,5-fache Siliziumkonzentration verwendet. Anschließend wurden alle Salze mit Ausnahme von Natriumchlorid in den Salzlösungen I und II (siehe Kapitel 7.2.2) verdoppelt beziehungsweise vervierfacht. Darin befinden sich die Elemente Kalium, Brom, Bor, Fluor, Magnesium, Calcium und Strontium. Die besten Ergebnisse lieferte eine Verdopplung der Salze. So wurde eine Zellzahl von  $3,0\cdot 10^8 \text{ Zellen}\cdot\text{ml}^{-1}$  und eine Coccolithen-Konzentration von  $1,9\cdot 10^9 \text{ Coccolithen}\cdot\text{ml}^{-1}$  erreicht. Im Vergleich zur vorherigen Versuchsreihe nahm die Zellzahl um die Hälfte ab, aber die Coccolithen-Konzentration verzeichnete annähernd eine Verdopplung. Dies könnte, wie bereits in Kapitel 4.1 beschrieben wurde, daran liegen, dass die Zellen nicht zeitgleich den Zellzyklus und die Kalzifizierung durchführen können.

Durch die Verdopplung der Salzlösungen I und II wurde die Calciumkonzentration verdoppelt. Calcium gelangt durch Verwitterung ins Wasser und liegt dort in kationischer Form ( $\text{Ca}^{2+}$ ) oder in anderen ionischen Verbindungen vor [62]. Generell ist der Bedarf der Algen an Calcium gering [62]. Für Coccolithophoriden ist es jedoch essentiell zur Produktion der Kalkpartikel. Da die Calciumkonzentrationen der Ozeane zur Kreidezeit deutlich höher waren, als sie es heute sind, könnte die Entwicklung der Coccolithenbildung ein evolutionäres Überbleibsel sein [149]. Die Kalzifizierung könnte so den Nutzen für die Zelle haben, hohe extrazelluläre Calciumkonzentrationen überleben zu können [149]. Je nach Salinität des Mediums liegt der Calciumgehalt einer Coccolithe bei  $0,67 \text{ pg}$  [55, 172].

Durch die Erhöhung der Calcium- und auch der Hydrogencarbonat-Konzentration aus den Salzlösungen I und II wurden beide Reaktanden der Kalzifizierungsreaktion gesteigert (siehe Kapitel 2.2). Eine Erhöhung der Calciumkonzentration ( $0\text{-}20 \text{ mM}$ ) korreliert laut Literaturangaben positiv mit der Kalzifizierung [80, 149]. Bei Calciumkonzentrationen von über  $50 \text{ mM}$  wurde die Photosynthese- sowie Kalzifizierungsrate stark gehemmt und führten bei langer Inkubation sogar zum Zelltod [80]. In dieser Versuchsreihe lag die Calciumkonzentration bei  $16 \text{ mM}$  und somit im Bereich der positiven Korrelation. Dies könnte bedeuten, dass durch eine weitere Steigerung der

Calciumkonzentration die Kalzifizierung möglicherweise weiter zunehmen könnte. Jedoch muss der Nutzen abgeschätzt werden, da eine zu hohe intrazelluläre Calciumkonzentration zytotoxisch ist und zur Aggregation von Proteinen und Nukleinsäuren führen kann sowie die Ausfällung von Phosphaten induziert [34]. Diese toxische Konzentration kann auch unter 50 mM liegen und das Wachstum früher negativ beeinträchtigen.

In dieser Versuchsreihe wurde auch die Magnesiumkonzentration des ESAW-Mediums erheblich gesteigert. Als Zentralatom von Chlorophyll und als Co-Faktor von RuBisCO ist Magnesium ein bedeutsames Element für die Photosynthese und somit essentiell für das Überleben der Algenzelle. Es wird zudem für die Bildung des Enzymes Katalase benötigt und fungiert als Coenzym in diversen enzymatischen Reaktionen, wie beispielsweise der Reduktase und bei der Carboxylierung [62]. Während eine Erhöhung der Calciumkonzentrationen einen positiven Effekt auf die Kalzifizierung zeigt, scheint dies nicht auf Magnesium zuzutreffen. So zeigten die Ergebnisse von Herfort et al. [80], dass die Verkalkung sehr empfindlich auf die Magnesiumkonzentration im Medium reagiert. Niedrige Konzentrationen führen zu Missbildungen von Coccolithen und hohe Konzentrationen verursachten neben einer generellen Missbildung zudem eine Unterverkalkung [80]. Makellose Coccolithen konnten nur mit Magnesiumkonzentrationen gebildet werden, die den Konzentrationen von Meerwasser entsprechen [80]. Im Meer liegt die Konzentration bei etwa 1280 mg·kg<sup>-1</sup> [222]. Die Dichte des ESAW-Mediums stimmt mit der von Meerwasser überein. Somit liegt die Magnesiumkonzentration dieser Arbeit bei etwa 1994 mg·kg<sup>-1</sup>, was nach den Ergebnissen von Herfort et al. [80] bereits zu einer Unterkalzifizierung geführt haben könnte. Aufgrund der Morphologie, die die Coccolithen bei der Verwendung dieses Modifikationsansatzes im Bag-Reaktor besaßen, könnte diese Vermutung durchaus zutreffen (siehe Abbildung 4.12). Diese Missbildung erfolgt vermutlich daraus, dass Magnesium (wie eventuell auch Silizium), anstelle von Calcium in die Coccolithen eingebaut werden könnte. Magnesium macht nach Calcium und Silizium den größten Anteil der Coccolithen aus [93]. Magnesium ist mit 24 g·mol<sup>-1</sup> im Vergleich zu Calcium mit 40,1 g·mol<sup>-1</sup> leichter, jedoch ist der Atomradius mit 150 pm im Vergleich zu 180 pm deutlich kleiner, was zur Missbildung der Coccolithen führen könnte [217].

Ein weiteres Element, welches durch eine Verdopplung der Konzentration einen nennenswerten Effekt auf die Kalzifizierung besitzen könnte, ist Strontium. Die Arbeitsgruppe von Jakob et al. [95] konnte durch die Erhöhung der Strontiumkonzentration in ihren Reaktorversuchen eine gesteigerte Coccolithenausbeute von >5 g·L<sup>-1</sup> erreichen. Strontium ist mit 0,6 % Bestandteil der Coccolithen und besitzt keinen negativen Einfluss auf die Coccolithenmorphologie [93, 116]. Dies überrascht, da Strontium mit 200 pm einen größeren Atomradius als Calcium besitzt [217]. Versuche von Jong et al. [101] haben gezeigt, dass Sr<sup>2+</sup> mit Ca<sup>2+</sup> bevorzugt vom Coccolith-Polysaccharid gebunden wird. Dies lässt auch hier vermuten, dass der Strontiumgehalt in den Coccolithen kein starrer Wert ist und flexibel an die Umgebungskonzentrationen angepasst werden kann. Da kein negativer Einfluss auf die Coccolithen bekannt ist, kann eine Erhöhung der Strontiumkonzentration durchaus zu einer verbesserten Kalzifizierung geführt haben.

Bei einer Vervierfachung der Salzlösungen I und II sind die maximalen Konzentrationen der Zellsowie Coccolithenzahl stark reduziert (siehe Kapitel 7.3.3, Abbildung 7.17). Die Calciumkonzentration betrug in dieser Versuchsreihe 32 mM. Auch wenn erst ab einer Konzentration von 50 mM ein Absterben der Zellen beobachtet wird, so könnte diese Konzentration für das optimale

Wachstum und die Kalzifizierung bereits zu hoch gewesen sein [80]. Die in dieser Arbeit eingesetzte Calciumkonzentration könnte bereits zur Ausfällung von Phosphaten geführt haben, wodurch das Wachstum stark eingeschränkt werden würde [34]. Auch die Magnesiumkonzentration befand sich in einem Bereich, in dem die Coccolithen Missbildungen und eine Unterkalzifizierung zeigten [80]. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Konzentrationen zu hoch waren, um die Kalzifizierung zu unterstützen. Gleiches lässt sich für das Wachstum der Zellen vermuten. Die maximal erreichte Zell-Konzentration lag bei  $1,7 \cdot 10^5$  Zellen·ml<sup>-1</sup> und ist somit niedriger als bei unverändertem ESAW. Es wird stark vermutet, dass es sich bei diesen Zellen um die des Inokulums handelte und kein Wachstum stattgefunden hat.

### **4.3 Kultivierung von *Emiliana huxleyi* in vier Reaktorsystemen**

In diesem Versuchsteil sollte *E. huxleyi* im Pilotmaßstab kultiviert werden. Dabei wurden bereits bekannte Reaktoren (Rührkesselreaktor (1,6 L), Bag-Reaktor (14 L)) sowie neue Systeme (Schlauchreaktor (14 L) und Membranreaktor (1,8 L)) verwendet. Die verwendeten Reaktoren unterschieden sich beispielsweise in ihrer Begasungsart (Oberflächen-, Blasen- und Membranbegasung) oder in ihrer Durchmischung (Rührer, Blasen oder Wellen). So sollte eine umfangreiche Einschätzung der optimalen Bedingungen für die Kultivierung der Kalkalge geschaffen werden.

Während der Kultivierung wurden das Wachstum und die Kalzifizierung untersucht sowie der Nährstoffverlauf protokolliert. Da die Kultivierungen parallel zu den Versuchen der Optimierung des Mediums stattfanden, wurde im ersten Kultivierungsversuch mit dem fünften Modifikationsansatz und, im zweiten mit dem sechsten Modifikationsansatz kultiviert. In der zweiten Kultivierung wurden zudem einige Modifikationen an den Reaktoren durchgeführt, um Probleme, die in dem ersten Kultivierungsversuch auftraten, zu beheben (siehe Tabelle 4.12).

Tabelle 4.12: Unterschiede zwischen der ersten und zweiten Reaktorkultivierung

<b>1. Kultivierung</b>	<b>2. Kultivierung</b>
<p><b>Medium:</b> Fünfter Modifikationsansatz (siehe Kapitel 7.2.2)</p> <p><b>Rührkesselreaktor:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Eingebaute Stromstörer</li> <li>• Rührerdrehzahl von 150 rpm</li> <li>• Makromischzeit: 4,7 s</li> <li>• Begasungsrate: 0,05</li> <li>• CO<sub>2</sub>-Anteil der Begasung: 1%</li> </ul> <p><b>Bag-Reaktor:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Schüttelfrequenz von 50 rpm</li> <li>• Makromischzeit: 4,5 s</li> <li>• Begasungsrate: 0,05</li> <li>• CO<sub>2</sub>-Anteil der Begasung: 1%</li> </ul> <p><b>Schlauchreaktor:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Geringer Blasendurchmesser</li> <li>• Makromischzeit: -</li> <li>• Begasungsrate: 0,05</li> <li>• CO<sub>2</sub>-Anteil der Begasung: 1%</li> </ul> <p><b>Membranreaktor:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Schüttelfrequenz von 50 rpm</li> <li>• Makromischzeit: -</li> <li>• Begasungsrate: 0,05</li> <li>• CO<sub>2</sub>-Anteil der Begasung: 1%</li> </ul>	<p><b>Medium:</b> Sechster Modifikationsansatz (siehe Kapitel 7.2.2) ohne NaHCO<sub>3</sub></p> <p><b>Rührkesselreaktor:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Entfernung der Stromstörer</li> <li>• Verringerung der Rührerdrehzahl auf 100 rpm</li> <li>• Makromischzeit: 5,2 s</li> </ul> <p><b>Bag-Reaktor:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Keine weiteren Modifikationen</li> </ul> <p><b>Schlauchreaktor:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Größerer Blasendurchmesser</li> <li>• Makromischzeit: 3 h &lt; x &lt; 16 h</li> </ul> <p><b>Membranreaktor:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Schüttelfrequenz von 75 rpm</li> <li>• Einbau eines Zuluftfilters</li> <li>• Makromischzeit: -</li> </ul>

Abbildung 4.11 fasst die Ergebnisse der Kultivierungen zusammen. In der Grafik werden die maximalen Zell- (grün) und Coccolithen-Konzentrationen (grau) der Versuchsreihen dargestellt. Die detaillierten Kurvenverläufe sind im Anhang unter Kapitel 7.3.4 zu finden.

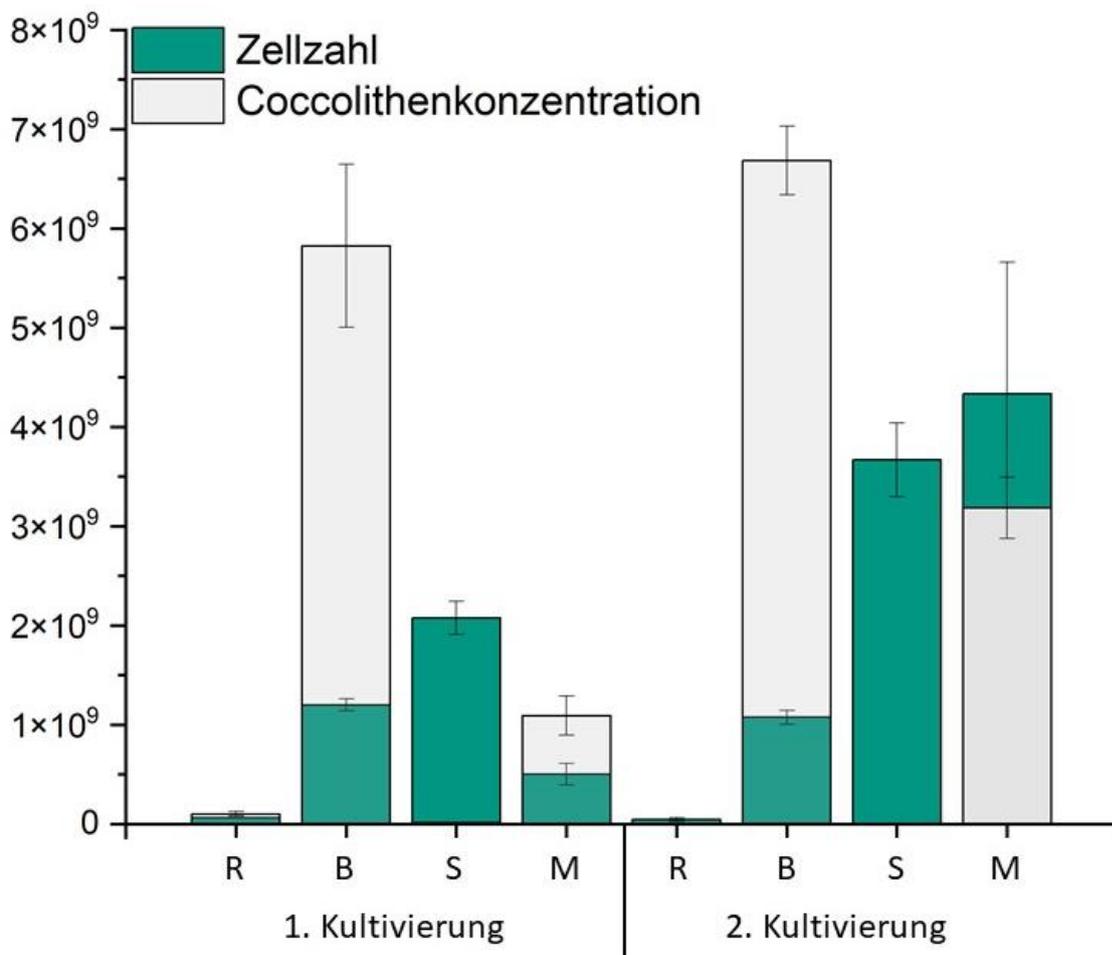


Abbildung 4.11: Überblick der Ergebnisse aus den Reaktorversuchen. Abkürzungen stehen für R: Rührkesselreaktor, B: Bag-Reaktor, S: Schlauchreaktor, M: Membranreaktor

In keiner Kultivierung kam es zu einer Limitierung an Phosphat, Nitrat und Calcium (siehe Anhang Kapitel 7.3.4, Abbildung 7.20 und Abbildung 7.22). Sobald die Nährstoff-Konzentrationen von Phosphat und Nitrat unter 10 % der Ausgangskonzentration fiel, wurden sie auf 110 %, 120 % beziehungsweise 130 % dieser Konzentration aufgefüllt.

#### 4.3.1 Der Rührkesselreaktor

Tabelle 4.13 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Kultivierungen im Rührkesselreaktor. Da die Kultur in der ersten Kultivierung weder Wachstum noch Kalzifizierung zeigte, konnten keine Wachstumsrate und Coccolithen-Produktivität oder die Coccolithenmasse bestimmt werden.

Tabelle 4.13: Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem Rührkesselreaktor

	1. Kultivierung	2. Kultivierung
Maximale Zell-Konzentration [Zellen·ml <sup>-1</sup> ]	6,3·10 <sup>7</sup>	4,4·10 <sup>7</sup>
Gemittelte Wachstumsrate [d <sup>-1</sup> ]	-	0,03
Maximale Coccolithen-Konzentration [Coccolithen·ml <sup>-1</sup> ]	1,0·10 <sup>8</sup>	1,5·10 <sup>8</sup>
Gemittelte zelluläre Coccolithen-Produktivität [Coccolithen·Zelle <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> ]	-	1,86
Maximale Coccolithenmasse [g·L <sup>-1</sup> ]	-	1,07
Gemittelte volumetrische Coccolithen-Produktivität [g·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> ]	-	-

Während der ersten Kultivierung mit dem Rührkesselreaktor konnte eine maximale Zellzahl von  $6,3 \cdot 10^7$  Zellen·ml<sup>-1</sup> erreicht werden. Dieser Wert wurde am zweiten Kultivierungstag verzeichnet. Am darauffolgenden Tag sank die Konzentration bereits, wodurch ein Wachstum ausgeschlossen werden kann. Ähnliche Ergebnisse lieferte die Auswertung der Coccolithen-Konzentration. Die maximale Konzentration wurde am Tag des Inokulierens bestimmt. Dennoch wurde die Kultivierung für insgesamt 14 Tage durchgeführt, um eine verlängerte Lag-Phase auszuschließen. Dabei konnte beobachtet werden, dass sich ab Kultivierungstag 11 vermehrt Ablagerungen innerhalb des Reaktors gebildet hatten (siehe Anhang Kapitel 7.3.4, Abbildung 7.23). Diese befanden sich vorwiegend zwischen den Strömungsbrechern und der Reaktorwand sowie zwischen der pO<sub>2</sub>-Sonde und den Stromstörern. Ein Grund für diese Aggregatbildung könnte an der Bauweise des Reaktors mit vielen engen Spalten sein, die eine Anhaftung der Zellen begünstigt. Eine weitere Möglichkeit für die Agglomeration könnte der herrschende Scherstress in einem gerührten Bioreaktor sein. So gewährleisteten die verbauten Rushton-Rührer und Stromstörer zwar eine gute Durchmischung und Vermeidung von Totzonen, erhöhen dadurch jedoch auch die Scherbelastung [119]. In den Rührkesselversuchen wurde eine Kopfraumbegasung verwendet, weshalb der Einbau von Röhrelementen unausweichlich war. Für Organismen, die empfindlich auf mechanische Belastung reagieren, wozu auch *E. huxleyi* gehört, führt dies oft zu einem verschlechterten Wachstum [144]. Algen, die Scherbelastungen ausgesetzt sind, können extrazelluläre polymere Substanzen (Glykoproteine und Enzyme) synthetisieren, die zu einer Anhaftung an Oberflächen beitragen [268]. Auch *Emiliana huxleyi* ist in der Lage diese Substanzen herzustellen [36]. Zusätzlich fördern auch freie Coccolithen die Agglomeration [36]. Durch diese Zellablagerungen kann das Eindringen der Lichtstrahlen reduziert werden, was in Folge die Biomasse-Produktivität verringern kann [268]. Dieser Effekt ist für andere Kultivierungen relevant, kann jedoch auf Grund der geringen Zellkonzentration im Rührkesselreaktor vernachlässigt werden. Ein größeres Problem besteht darin, dass angehaftete Zellen durch das Probenahmeventil nicht mehr erfasst werden können, wodurch sich die rasch sinkende Zellzahl dieses Versuches erklären lässt.

Um die Scherbelastung auf die Algen zu reduzieren, wurden in der zweiten Kultivierung die Stromstörer entfernt und die Rührerdrehzahl verringert. Die erreichte Zell-Konzentration war mit  $4,4 \cdot 10^7$  Zellen·ml<sup>-1</sup> sogar niedriger als in der ersten Versuchsreihe, dennoch konnte eine Wachstumskurve beobachtet werden (siehe Anhang Kapitel 7.3.4, Abbildung 7.21). Ab dem 3. Kultivierungstag konnten schwarze Aggregate in der Kulturbrühe beobachtet werden, die bis zum Ende der Kultivierung bestehen blieben (siehe Anhang Kapitel 7.3.4, Abbildung 7.24). Vermutlich handelte es sich dabei um eine Kontamination mit einem Schimmelpilz. Es ist bereits bekannt, dass

Schimmelpilze in Meerwasser nachgewiesen werden können, jedoch ist ihr Einfluss auf Coccolithophoriden bisher nicht genauer untersucht worden [175, 246].

In den Versuchen von Jakob et al. [95] konnten bei der Verwendung eines Rührkesselreaktors ähnlich hohe Zell-Konzentrationen erreicht werden. Dort zeigte die Kultur einen typisch mikrobiellen Wachstumsverlauf [95]. Auch in dieser Arbeit wurde in Kapitel 4.1 ein Rührkesselreaktor für die Untersuchung des Wachstums in Hell-Dunkel-Zyklen verwendet. Die dabei erreichte Zell-Konzentration war geringfügig höher als in diesen Versuchen und es wurden keine Zellablagerungen beobachtet. Aufgrund der Entfernung der Stromstörer und der Erniedrigung der Rührerdrehzahl sowie der Verwendung des modifizierten Mediums wurde ein verbessertes Wachstum erwartet. Durch die Modifikation des Reaktors lag die Reynoldszahl bei etwa 6107 und war somit um ein Drittel niedriger als in der ersten Kultivierung. Der volumetrische Leistungseintrag lag in der zweiten Kultivierung bei etwa  $6,4 \text{ W}\cdot\text{m}^{-3}$  und somit noch unterhalb des Bereiches eines gerührten Bioreaktors für die Kultivierung von tierischen Zellen ( $10\text{-}40 \text{ W}\cdot\text{m}^{-3}$ ), die ebenfalls als scherempfindlich gelten [58, 96, 110].

Die höchste Coccolithen-Konzentration der ersten Kultivierung wurde am Tag der Inokulation gemessen. Hieraus lässt sich ableiten, dass keine aktive Kalzifizierung stattfand. Obwohl die erreichte Zell-Konzentration in der zweiten Kultivierung niedriger ausfällt, ist die maximale Coccolithen-Konzentration dennoch höher als in der ersten Kultivierung. Sie wird am Tag 15 erreicht und lässt vermuten, dass die Zellen kalzifiziert haben. So konnte auch eine Coccolithenmasse von  $1,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  bestimmt werden. Diese Ergebnisse sind jedoch anzuzweifeln. Aufgrund der Kontamination wurde zum einen die Bestimmung der Coccolithen-Konzentration und zum anderen auch die der Coccolithenmasse negativ beeinflusst. Darüber hinaus bildeten sich durch die Kontamination Pellets, die auch durch die Aufreinigung nicht entfernt werden konnten.

Der Aufbau des Rührkesselreaktors ist im Vergleich zu den anderen Reaktortypen zeitintensiv und somit aus dem wirtschaftlichen Blickwinkel kostenintensiv. Dennoch besitzt er aufgrund der Möglichkeit zur Autoklavierung einen klaren Vorteil. Des Weiteren ist der Reaktor durch die Konstruktion aus Stahl und Glas sehr leicht zu reinigen und kann für unzählige Kultivierungen wieder verwendet werden. Der Scale-Up dieser Reaktorgeometrie ist zudem industriell bereits etabliert. Aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse eignet sich der Rührkesselreaktor für die Kultivierung von *E. huxleyi*.

### 4.3.2 Der Bag-Reaktor

Die folgende Tabelle 4.14 gibt eine Zusammenfassung der Ergebnisse, die während der Kultivierungsversuche im Bag-Reaktor erreicht wurden.

Tabelle 4.14: Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem Bag-Reaktor

	<b>1. Kultivierung</b>	<b>2. Kultivierung</b>
Maximale Zell-Konzentration [Zellen·ml <sup>-1</sup> ]	1,2·10 <sup>9</sup>	1,1·10 <sup>9</sup>
Gemittelte Wachstumsrate [d <sup>-1</sup> ]	0,26	0,22
Maximale Coccolithen-Konzentration [Coccolithen·ml <sup>-1</sup> ]	5,8·10 <sup>9</sup>	6,7·10 <sup>9</sup>
Gemittelte zelluläre Coccolithen-Produktivität [Coccolithen·Zelle <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> ]	0,39	0,41
Maximale Coccolithenmasse [g·L <sup>-1</sup> ]	3,03	3,80
Gemittelte volumetrische Coccolithen-Produktivität [g·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> ]	0,11	0,17

Jakob et al. [95] etablierten die Kultivierung in diesem Reaktorsystem bereits 2018 und führten erste Vorversuche durch. Die Arbeitsgruppe verwendete dafür ein eigenes, modifiziertes ESAW-Medium. Die Konzentrationen an Nitrat, Phosphat sowie Calcium wurden von ihnen täglich gemessen und individuell nachgefüllt [95]. Dabei erreichten sie eine maximale Wachstumsrate von 0,62 d<sup>-1</sup> und eine Zellzahl von 1,6·10<sup>7</sup> Zellen·ml<sup>-1</sup> [95]. Bei einem direkten Vergleich der Ergebnisse zeigt sich, dass in dieser Arbeit während der ersten Kultivierung eine 75-fache Erhöhung der Zellzahlen erreicht wurde. Auch im Vergleich zur bisher höchsten erreichten Zell-Konzentration von 3,0·10<sup>7</sup> Zellen·ml<sup>-1</sup>, ist sie fast um den Faktor 40 höher [75, 95].

Bei der Verwendung von Reaktoren mit solch hohen Schichtdicken, wie es bei dem Bag-Reaktor der Fall ist, bilden sich, bezogen auf die Lichtverfügbarkeit, mehrere Schichten. Am oberen Reaktoräußeren entsteht eine Zone, in der die volle Lichtintensität auf die Oberfläche trifft (photische Zone). Im Reaktorinneren herrschen dann Schwachlichtbedingungen. Ganz unten entsteht eine Zone mit völliger Dunkelheit (aphotische Zone) [211, 258]. Wie in Kapitel 4.1 bereits ausführlich beschrieben wurde, kann der Einsatz von Hell-Dunkel-Zyklen das Wachstum von vielen Mikroalgen, so auch *E. huxleyi*, positiv beeinflussen [168]. Die Hell-Dunkel-Zyklen, welche die Zellen, abhängig von der Durchmischung, in einem Photobioreaktor erfahren liegen in einem Bereich von 0,1-2 Hz und sind somit zu kurz, als dass intrazelluläre Energiespeicher eine Wirkung besitzen. Sie sind zudem keinesfalls vergleichbar mit den Zyklen, die in dieser Arbeit getestet wurden. Dennoch scheinen auch solche kurzen Lichtimpulse einen Einfluss auf das Wachstum von Mikroalgen zu besitzen. Die Arbeitsgruppe von Xue et al. [258] konnte in ihren Versuchen beobachten, dass die spezifische Wachstumsrate von *S. platensis* bei hochfrequenten (>0,1 Hz) Hell-Dunkel-Zyklen höher war als bei niedrigen Frequenzen (<0,1 Hz). Von allen Reaktoren, die in dieser Arbeit untersucht wurden, besitzt der Bag-Reaktor mit 4,5 s die geringste Makromischzeit, was einer Hell-Dunkel-Frequenz von 0,22 Hz entspricht. Da der Bag-Reaktor trotz hoher Schichtdicke eine bemerkenswerte Zellzahl erreicht, könnte diese Hell-Dunkel-Frequenz das Wachstum durchaus positiv beeinflusst haben.

Von allen Reaktoren erreicht der Bag-Reaktor die höchste Coccolithen-Konzentration. Zudem wurde in der zweiten Kultivierung eine Coccolithenmasse von  $3,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  gemessen. Die Kalzifizierung ist ein lichtabhängiger Prozess und profitiert von einer kontinuierlichen Belichtung [125, 167]. Aufgrund der hohen Schichtdicke und Zell-Konzentration könnte die Frage aufkommen, ob das verfügbare Licht reicht, um den hohen Energiebedarf der Kalzifizierung zu decken (siehe Kapitel 4.1). Aufgrund der hohen Coccolithen-Konzentrationen, die im Bag-Reaktor erreicht wurden, scheint dies durchaus möglich gewesen zu sein. Wie bereits schon in Kapitel 4.1 diskutiert wurde, ist die Funktion der Coccolithen ungeklärt. So existiert die Vermutung, dass die Coccolithen als Lichtschattierer beziehungsweise Lichtsammler fungieren könnten [143]. Aufgrund der Ergebnisse des Bag-Reaktors wäre eine Funktion als Lichtsammler vorstellbar, welche das spärlich verfügbare Licht bündeln und somit eine höhere Lichtnutzungseffizienz erzielen könnten. Davon abgesehen besitzt auch die Reaktorkonstruktion selbst einen Einfluss auf die Kalzifizierung. Die durch den Rotationsschüttler erzeugten Wellen erhöhen zum einen die Turbulenzen in dem Reaktor, um Sedimentation zu verhindern und den Gaseintrag über die Oberfläche zu unterstützen, zum anderen können sie bei vereinzelt Coccolithophoren zu einer erhöhten Kalzifizierung führen [229]. Der Energieeintrag im Bereich kleiner Längenskalen (Micro-Eddies) ist gering. Dies führt zu einem wesentlichen schonenderen Verhalten im Vergleich zum Rührkessel beziehungsweise Schlauchreaktor. Da die Turbulenzen im Bag-Reaktor durch Wellen erzeugt werden, könnte so die Kalzifizierung gefördert werden, ohne die Cocosphäre oder die Zellen zu schädigen.

Da in der zweiten Kultivierung keine Modifikationen des Reaktors durchgeführt wurden, sondern nur ein Austausch des Mediums stattfand, sind die verbesserten Ergebnisse auch alleinig auf dessen positiven Effekt zurückzuführen. Während der zweiten Kultivierung wurden insgesamt  $409,6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  an Calcium verbraucht (siehe Abbildung 7.22). Für die erreichte Coccolithen-Konzentration und einem theoretischen Coccolithengewicht von  $2,5 \text{ pg}$  wäre jedoch ein Bedarf von fast  $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  notwendig gewesen. Für eine Erklärung dieser Diskrepanz sind mehrere Ansätze vorstellbar. Das Coccolithengewicht wird häufig mit einem Wert zwischen  $2$  und  $3 \text{ pg}$  angegeben [95, 241, 262]. Dies scheint jedoch variabel zu sein. So wurden auch Massen von  $0,6 \text{ pg}$  und  $1,8 \text{ pg}$  gefunden [55, 262]. In dieser Arbeit würde so eine Coccolithenmasse von  $0,6 \text{ pg}$  erreicht werden. Dies würde den Calciumbedarf deutlich verringern, dennoch wäre er mit  $1,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  noch immer zu hoch. Wie in Kapitel 4.2.2 bereits beschrieben wurde, bestünde die Möglichkeit, dass Calcium durch andere Elemente wie Strontium, Silizium und Magnesium ausgetauscht werden könnte. Dafür sprechen einige Indizien. Da das Molekulargewicht von Silizium und Magnesium nur etwa halb so groß ist wie das von Calcium, würde ein Austausch dazu führen, dass das Gewicht der Coccolithen abnähme. Des Weiteren besitzen die drei Elemente Einfluss auf die Coccolithenmorphologie. Durch eine Erhöhung der Magnesiumkonzentration konnten Missbildungen und eine Unterkalzifizierung beobachtet werden [80]. Eine Erhöhung der Strontiumkonzentration zeigte keinen negativen Einfluss auf die Morphologie [93, 116]. Eine Verringerung der Siliziumkonzentration führte dagegen zu Fehlbildungen und vermutlich zu Unterkalzifizierung [95]. Die Coccolithen dieser Kultivierung wurden mit einem Rasterelektronenmikroskop untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.12 gezeigt.

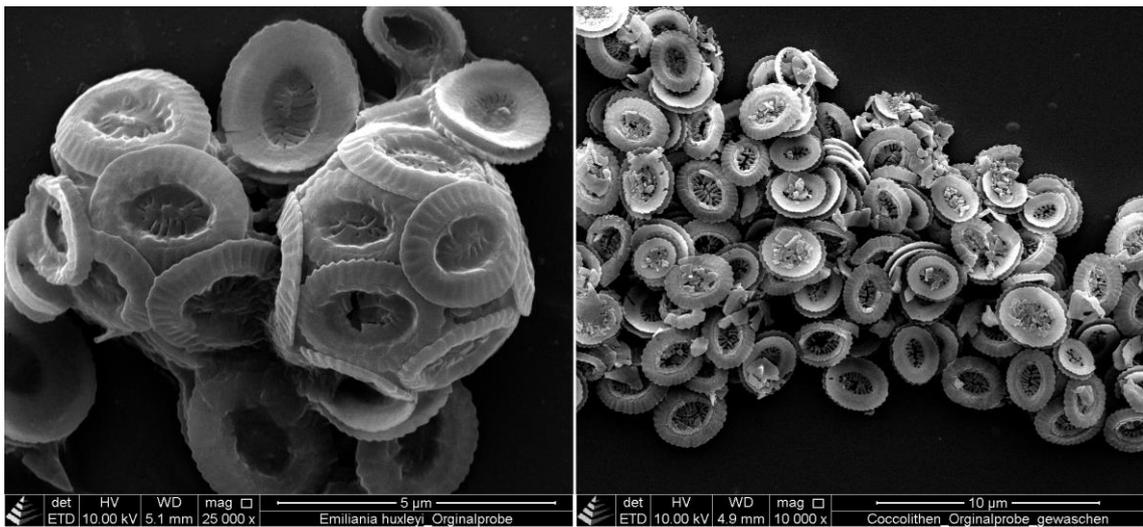


Abbildung 4.12: Links: *E. huxleyi*-Zellen und Coccolithen in unbehandelten ESAW-Medium. Rechts: Coccolithen aus der zweiten Kultivierung im Bag-Reaktor (Fotos von: Dr. Birgit Hetzer, Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik, Max Rubner-Institut, Karlsruhe)

So ist zu erkennen, dass die Coccolithen, die aus dem Bag-Reaktor isoliert wurden, deutlich filigraner waren. Dies lässt auf eine Unterkalzifizierung schließen. Da die Siliziumkonzentration durch den fünften Modifikationsansatz des ESAW-Mediums stark erhöht wurde, kann ein Mangel ausgeschlossen werden. Somit gilt ein Austausch von Calcium durch Magnesium als wahrscheinlich.

Diese Theorie zeigt jedoch Widersprüche. So sind die Coccolithen aus der ersten Kultivierung mit 0,52 pg noch leichter. Dies würde bedeuten, dass Silizium anstelle von Calcium eingebaut worden wäre, da weder Magnesium und Strontium in dem verwendeten Medium erhöht wurden. Dies könnte zwar erklären, warum nur 156 mg Calcium·L<sup>-1</sup> anstelle von 1 g·L<sup>-1</sup> verbraucht wurden, jedoch würde die eingesetzte Siliziumkonzentration dies nicht decken können. Somit kann das Element, dass die Coccolithenmorphologie negativ beeinflusst durch die Messmethoden nicht eindeutig identifiziert werden. Es ist zudem nicht unwahrscheinlich, dass dies auch ein Resultat der Wechselwirkung verschiedener Elemente miteinander ist.

Der Bag-Reaktor kann von allen hier verwendeten Reaktoren am schnellsten aufgebaut werden. Durch das Anbringen beliebiger Anschlüsse kann er stets optimal an den Prozess angepasst werden und ist somit in seinem Einsatz flexibel. Auch seine Grundflächenausnutzung mit 95,2 L·m<sup>-2</sup> ist optimal. Ein Scale-Up hingegen ist, wie bei anderen Photobioreaktoren nur durch Numbering-Up möglich. Bei der Verwendung von künstlicher Beleuchtung ist eine Anordnung der Reaktoren übereinander vorstellbar. Es sind zudem auch Mechanismen für die Durchmischung vorstellbar, die weit weniger aufwändig sind, wie der benutzte Rotationsschüttler.

### 4.3.3 Der Schlauchreaktor

Eine Kultivierung von *E. huxleyi* in einem Schlauchreaktor wurde bisher noch nicht publiziert. Tabelle 4.15 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse, die während der Kultivierungen mit diesem Reaktortyp erreicht wurden. Da der Begasungsschlauch aus der ersten Kultivierung entsorgt wurde, konnte für diesen Aufbau keine Mischzeit bestimmt werden.

Tabelle 4.15: Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem Schlauchreaktor

	1. Kultivierung	2. Kultivierung
Maximale Zell-Konzentration [Zellen·ml <sup>-1</sup> ]	2,1·10 <sup>9</sup>	3,7·10 <sup>9</sup>
Gemittelte Wachstumsrate [d <sup>-1</sup> ]	0,30	0,31
Maximale Coccolithen-Konzentration [Coccolithen·ml <sup>-1</sup> ]	1,3·10 <sup>7</sup>	1,7·10 <sup>5</sup>
Gemittelte zelluläre Coccolithen-Produktivität [Coccolithen·Zelle <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> ]	-	-
Maximale Coccolithenmasse [g·L <sup>-1</sup> ]	-	-
Gemittelte volumetrische Coccolithen-Produktivität [g·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> ]	-	-

Die im Schlauchreaktor erreichten Zell-Konzentrationen, sind sehr viel höher als die aus dem Rührkessel- und Bag-Reaktor. Während der ersten Kultivierung konnte in den ersten 21 Tagen keine Zunahme der Zellzahl beobachtet werden. Bei einer Überprüfung der Ursachen wurde festgestellt, dass sich die Zellen unter dem Begasungsschlauch gesammelt hatten. Dabei bildete sich ein Sediment von mehreren Zentimetern Höhe (siehe Anhang Kapitel 7.3.4, Abbildung 7.25). Aufgrund der Höhe der Ablagerung handelte es sich vermutlich nicht nur um die Zellen des Inokulums, sondern auch um neugewachsene Biomasse. Dies wurde wahrscheinlich durch die niedrige Begasungsrate von 0,05 vvm verursacht [144]. Um dieses Problem zu lösen, wurde an Tag 16 der Reaktor aufgewirbelt. Die Zellzahl stieg daraufhin an und es hätte gegebenenfalls die Lag-Phase schon früher beendet sein können.

Während der zweiten Kultivierung begann das Wachstum deutlich früher, obwohl der Reaktor nicht aufgewirbelt wurde. Von Tag 13 bis 17 wurde eine quasi-stationäre Phase beobachtet. Danach stieg die Zellzahl bis zum Maximalwert weiter an. Solch eine Verzögerung des Wachstums ist ungewöhnlich und lässt oft auf eine Nährstofflimitierung schließen [200]. Wie in Abbildung 7.22 zu sehen ist, war an Tag 13 und 15 das vorhandene Phosphat vollständig aufgebraucht. Die Konzentration wurde noch am selben Tag aufgefüllt, jedoch könnte daraus die beobachtete Verzögerung des Wachstums resultiert sein. Eine weitere Ursache, die dieses Plateau erzeugt hat, könnte auch die Auszählmethode mit der Thoma-Kammer sein. Im Laufe der Kultivierung wurde beobachtet, dass sich viele Zellen für die Auszählung in der falschen Ebene befanden und daher nicht berücksichtigt wurden. Ab Tag 20 wurden die Proben vor dem Auszählen 2 Minuten ruhen gelassen, wodurch sich die Zellen absetzen konnten. Dies lässt vermuten, dass die Zellzahl in den Tagen zuvor höher gewesen wäre und eventuell sogar ein höheres Maximum früher erreicht worden wäre.

Die verwendete Blasenbegasung scheint einen enorm positiven Effekt auf das Wachstum der Alge zu besitzen. Der Blasendurchmesser während der ersten Kultivierung war sehr gering, was zu

einer größeren Gasaustauschfläche führte als beispielsweise eine Kopfraumbegasung wie im Bag- oder Rührkesselreaktor. So könnte im Gegensatz zu den anderen Reaktortypen eine verbesserte CO<sub>2</sub>-Versorgung vorliegen. Aufgrund des guten Wachstums der Zellen besaß der Reaktor zu Beginn der Kultivierung eine typische gelbliche Verfärbung. Ab Tag 25 fand ein Farbumschlag in ein deutliches Grün statt (Siehe Anhang 8.3.2, Abbildung 7.26). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Zellen vermehrt Chlorophyll produziert haben. Hariskos et al. [76] stellten die Hypothese auf, dass *E. huxleyi* mehr Chlorophyll synthetisieren kann, um eine Abschattung durch umliegende Zellen auszugleichen (Akklimation), was in Anbetracht der hohen Zell-Konzentration eine realistische Möglichkeit wäre.

Während der ersten Kultivierung zeigte sich die schlechte Kalzifizierung bereits früh unter dem Mikroskop. Dort wurden viele Zellen ohne Coccolithen beobachtet (siehe Anhang Kapitel 7.3.4, Abbildung 7.27). Diese nicht-kalzifizierten Zellen wurden aus dem Reaktor entnommen und für 18 Tage in einem Schüttelkolben inkubiert, doch auch hier konnte keine erneute Kalzifizierung der Zellen beobachtet werden (siehe Anhang Kapitel 7.3.4, Abbildung 7.28). Verschiedene Arbeitsgruppen beobachteten, dass kalzifizierende Zellen sich zu einem N (nackt)-Morphotyp umwandeln können. Eine Rückkehr in die kalzifizierende Form wurde bisher jedoch nicht bewiesen [63, 106, 107, 133, 171].

Bei dem Versuch die Coccolithen-Konzentration zu bestimmen, führte die hohe Zellzahl zu unerwarteten Problemen, da es zu keiner kompletten Trennung der Zelltrümmer und den Coccolithen kam. Außerdem wurden unter dem Mikroskop Kristalle gefunden, die das Auszählen der Coccolithen zusätzlich erschwerten. Wird davon ausgegangen, dass jede Zelle durchschnittlich 10 Coccolithen besitzt, wurden in dieser Arbeit nur 0,06 % der erwarteten Coccolithen-Konzentration mit einem Wert von etwa  $2,0 \cdot 10^{10}$  Coccolithen·ml<sup>-1</sup> erreicht [75]. Die geringen Coccolithen-Konzentrationen können zum einen dadurch erklärt werden, dass die *E. huxleyi* nicht zeitgleich die Zellteilung und Kalzifizierung durchführen kann [125]. Zum anderen wirkte sich vermutlich auch die Blasenbegasung negativ auf die Kalzifizierung aus. Es ist bereits bekannt, dass durch das Zerplatzen von Blasen an der Oberfläche des Kultivierungsmedium die Zellen an der Blasengrenzfläche beschädigt oder sogar zerrissen werden können [144]. Aufgrund der hohen Zell-Konzentrationen im Schlauchreaktor scheint dieser Effekt auf die Algen nicht signifikant gewesen zu sein. Dies kann jedoch nicht pauschal auf die Coccosphäre übertragen werden. Da nach Beendigung der Kultivierung bei der Reinigung des Reaktors unter dem Begasungsschlauch weiße Ablagerungen gefunden wurden und sich unter dem Mikroskop herausstellte, dass es sich dabei um Coccolithen handelte, scheint diese Erklärung plausibel zu sein. Ein weiterer negativer Aspekt ist, dass aufgrund der größeren Gasaustauschfläche und der dadurch resultierenden erhöhten CO<sub>2</sub>-Konzentration die Kalzifizierungsrate verringert wird [54]. Hohe CO<sub>2</sub>-Konzentrationen können die Größe der Coccolithen und Coccosphäre verringern und führen zu einem geringeren Coccolithengewicht [54].

Für die zweite Kultivierung wurde der Begasungsschlauch ausgetauscht, wodurch größere Blasen entstanden und der so entstehende Druck beim Platzen reduziert wird [20]. Zudem sollte die Durchmischung verbessert werden, um zu verhindern, dass die Algen auf den Reaktorboden absinken. Biomasse, die sich in diesen Totzonen ansammelt, könnte durch Zerfallsprodukte das Wachstum von Fremdorganismen fördern [69]. Da der Schlauchreaktor ein unsteriles System ist,

sollte dieses Problem vorzeitig beseitigt werden. Durch die Modifikation wurde das Problem der Sedimentation während der zweiten Kultivierung behoben.

Die Modifikation des Reaktors zeigte einen positiven Effekt auf das Wachstum der Algen. Dies hatte jedoch zur Folge, dass der Zelldurchmesser mit  $2,7\ \mu\text{m}$  (mikroskopische Vermessung,  $n=50$ ) deutlich geringer war als der der Zellen aus der Stammhaltung. Dort lag der Durchmesser bei  $7\ \mu\text{m}$  (elektronenmikroskopische Messung, durchgeführt von Dr. Birgit Hetzer, Max-Rubner-Institut, Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel im Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik, Karlsruhe). Bei den beobachteten Zellen könnte es sich um Tochterzellen handeln, die gerade den Zellzyklus durchlaufen haben. So finden in der linearen Wachstumsphase etwa 1,1 Teilungszyklen pro Tag statt. Dies entspricht annähernd den Teilungszyklen (1,3), die die Zellen während eines Tag-Nacht-Zyklus in der Dunkelphase erreicht haben (siehe Kapitel 4.1.2). Eine weitere Möglichkeit wäre, dass kleinere Zellen ein größeres Oberflächen-zu-Volumenverhältnis besitzen, was die Diffusion zwischen der Zelle und dem Medium verbessert [203].

Der vergrößerte Blasendurchmesser zeigte nicht den gewünschten Effekt auf die Coccoosphäre. Die maximal ermittelte Coccolithen-Konzentration war so niedrig, dass sich vermuten lässt, dass es sich dabei um die Coccolithen des Inokulums handelte.

Der Schlauchreaktor kann sehr schnell aufgebaut und je nach Belieben und verfügbaren Platz können auch mehrere Schlauchreaktoren nebeneinander aufgehängt werden. Aufgrund der vielen Falten im Kunststoff ist dieser Reaktor sehr schwer zu reinigen und daher eher als Wegwerfprodukt gedacht. Der Schlauchreaktor besitzt die beste Grundflächennutzung aller in dieser Arbeit verwendeten Reaktoren. Wenn zukünftig das Problem der fehlenden Kalzifizierung in diesem Reaktortyp gelöst wird, besitzt er aufgrund der hohen Zell-Konzentrationen ein vielversprechendes Potential.

#### 4.3.4 Der Membranreaktor

Die maximalen Zell- und Coccolithen-Konzentrationen, die während den Kultivierungen im Membranreaktor erreicht wurden, sind in Tabelle 4.16 zusammengefasst. Um die Membran des Membranreaktors nicht zu verschmutzen, wurde für diesen Reaktor keine Makromischzeit bestimmt. Da der Membranreaktor ein ähnliches Durchmischungs-Prinzip wie der Bag-Reaktor besitzt, die Schichtdicke jedoch wesentlich geringer ist, fällt die Mischzeit dadurch wesentlich kürzer aus.

Tabelle 4.16: Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem Membranreaktor

	<b>1. Kultivierung</b>	<b>2. Kultivierung</b>
Maximale Zell-Konzentration [Zellen·ml <sup>-1</sup> ]	5,0·10 <sup>8</sup>	4,3·10 <sup>9</sup>
Gemittelte Wachstumsrate [d <sup>-1</sup> ]	0,26	0,19
Maximale Coccolithen-Konzentration [Coccolithen·ml <sup>-1</sup> ]	1,1·10 <sup>9</sup>	3,2·10 <sup>9</sup>
Gemittelte zelluläre Coccolithen-Produktivität [Coccolithen·Zelle <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> ]	0,13	1,69
Maximale Coccolithenmasse [g·L <sup>-1</sup> ]	-	1,90
Gemittelte volumetrische Coccolithen-Produktivität [g·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> ]	-	0,26

Werden die Ergebnisse der beiden Kultivierungen mit den anderen Reaktoren verglichen, so scheint sich der Membranreaktor neben dem Bag-Reaktor am ehesten für die Kultivierung von *E. huxleyi* zu eignen. Der Einsatz eines Membranreaktors für die Kultivierung von *E. huxleyi* ist bisher noch nicht publiziert worden.

In der ersten Kultivierung konnten ab Kultivierungstag 15 deutliche Zellansammlungen zwischen der Reaktorwand und der Kühlschlange festgestellt werden (siehe Anhang Kapitel 7.3.4, Abbildung 7.31). Auf Grund dessen könnte die ermittelte Zell-Konzentration ab Tag 16 geringer ausgefallen sein. Zusätzlich konnte ab Tag 11 eine Kontamination in der Kulturbrühe beobachtet werden (siehe Anhang Kapitel 7.3.4, Abbildung 7.32). Vermutlich handelte es sich dabei um einen Schimmelpilz. Dieser hätte dann zu einer geringeren Zell-Konzentration geführt, wie es die Ergebnisse der zweiten Kultivierung vermuten lassen. Um die Zellablagerungen zu verhindern, wurde die Schüttelfrequenz auf 75 rpm erhöht. Zudem wurde ein Zuluftfilter eingebaut, um einer erneuten Kontamination entgegenzuwirken. Durch diese Modifikation konnte in der zweiten Kultivierung die höchste Zellzahl aller Reaktoren erreicht werden. Die Kultivierung dauerte jedoch mit 42 Tagen am längsten an. Ab Tag 16 wechselte die Farbe der Kulturbrühe von gelb zu grün (siehe Anhang Kapitel 7.3.4, Abbildung 7.35). Zu diesem Zeitpunkt überschritt die zweite Kultivierung die Zellzahl, die in der ersten Kultivierung das Maximum darstellte. Wie bereits erwähnt wurde, scheint dies auf eine erhöhte Chlorophyllsynthese der Zellen hinzudeuten, um den Verlust von Photonen durch Abschattung zu kompensieren [76]. Hieraus folgt zudem die Annahme, dass es in der ersten Kultivierung zu einer Limitierung von Elementen kam, die in direkter Verbindung zur Photosynthese stehen, wie beispielsweise Magnesium. Die Magnesiumkonzentration wurde jedoch erst im sechsten Modifikationsansatz (siehe Kapitel 7.2.2) erhöht, das dem Medium in der zweiten Kultivierung entspricht. In der Literatur konnte bisher kein Farbumschlag der Kulturbrühe von *Emiliana huxleyi* beobachtet werden, allerdings lag das bisher erreichte Zellmaximum nur bei 3,0·10<sup>7</sup> Zellen·ml<sup>-1</sup> und in den üblich publizierten Versuchen in Schüttelkolben liegt sie noch wesentlich niedriger [75, 95].

Während der ersten Kultivierung wird die maximale Coccolithen-Konzentration bereits an Tag 9 erreicht. Diese sinkt am darauffolgenden Tag rapide ab und liegt am Ende der Kultivierung lediglich bei einem Wert von 1,1·10<sup>7</sup> Coccolithen·ml<sup>-1</sup>. Durch die Kontamination konnte die Coccolithen-Konzentration nicht zuverlässig bestimmt werden, da es zu einer Fixierung der Algenzellen in einem Schimmelpilz kam (siehe Anhang Kapitel 7.3.4, Abbildung 7.33). Da der Reaktor auto-

klaviert geliefert und nur unter der Sterilbank geöffnet wurde, erfolgte die Kontamination vermutlich durch die ungefilterte Zuluft. In einer 3-jährigen Studie von Papadakis et al. konnte die Existenz von vielen Schimmelpilz-Arten wie beispielsweise *Aspergillus spp*, *Penicillium spp* und *Alternaria spp* in Meerwasser nachgewiesen werden [175]. Eine Kontamination mit *Aspergillus niger* kann dazu führen, dass das Medium, durch die Bildung von organischen Säuren, in kürzester Zeit auf einen pH-Wert unter 2 angesäuert wird [4]. Das Prozessleitsystem zeigte keinen Ausschlag des pH-Wertes in den sauren Bereich (siehe Anhang Kapitel 7.3.4, Abbildung 7.34), jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass der pH-Wert lokal angesäuert wurde, woraus eine Auflösung der Coccolithen resultieren könnte. Dies könnte zudem den Anstieg der Calciumkonzentration ab Tag 11 erklären (siehe Abbildung 7.20). Aufgrund der Kontamination konnte zudem die Coccolithenmasse nicht bestimmt werden. Laut Hariskos et al. [75] entspricht eine Zellzahl von  $5,0 \cdot 10^8$  Zellen·ml<sup>-1</sup> etwa 1,5 g·L<sup>-1</sup> aufgereinigter Coccolithen. Mit diesem angenommenen Wert wäre die Ausbeute etwa halb so hoch wie die erreichte Coccolithenmasse im Bag-Reaktor.

Die Coccolithen-Konzentration während der zweiten Kultivierung konnte erheblich gesteigert werden. Das Maximum wurde an Tag 14 erreicht, anschließend nahm die Coccolithen-Konzentration ab, bis ab Tag 21 keine Coccolithen mehr nachgewiesen werden konnten. In diesem Zeitraum konnten mehrere Effekte in der Kultur beobachtet werden. Zum einen nahm die Konzentration, kurz bevor die Kulturbrühe des Reaktors grün wurde, ab. Somit könnte der Farbumschlag auch durch ein Ab- oder Auflösen der Coccolithen stattgefunden haben. An Tag 16 sank der pH-Wert für 3 Minuten auf einen Bereich zwischen 7,1 und 7,5 (siehe Anhang Kapitel 7.3.4, Abbildung 7.34). Untersuchungen haben gezeigt, dass bei diesen pH-Werten die Kalzifizierung verringert ist, es konnte jedoch keine Auflösung von Coccolithen beobachtet werden [160]. Eine weitere Möglichkeit für die niedrige Coccolithen-Konzentration könnte die mutmaßliche Funktion der Coccolithen sein, die Zelle vor zu hohen Lichtintensitäten schützen [170, 257]. Bei den erreichten Zelldichten ist ihre Funktion hinfällig, was zu einem möglichen Abbau der Coccolithen führen könnte. Auch das Wachstum der Kultur könnte einen Effekt auf die Kalzifizierung haben. So wurde das Maximum der Coccolithen-Konzentration an dem Tag gemessen, an dem die Kultur in die lineare Wachstumsphase übergeht (siehe Kapitel 7.3.4, Abbildung 7.21). Indes wäre das weiterer Beweis, dass die Kalzifizierung zugunsten des Zellwachstums herunter reguliert wird. Jedoch ist das Ausmaß in diesem Versuch stärker, sodass in der gesamten restlichen Kultivierungsdauer keine Coccolithen mehr gebildet wurden.

Die schonende Membranbegasung hat sich äußerst positiv auf das Wachstum der Zellen ausgewirkt und die große Membranoberfläche ermöglichte eine gute Gasversorgung [64]. Da der Reaktor vorwiegend aus Plexiglas besteht, lässt er sich zudem sehr gut reinigen. Jedoch muss hier im Vergleich zum Rührkesselreaktor vorsichtiger gearbeitet werden, da es sonst leicht zu Rissen kommen kann, zumindest bei dem eingesetzten kommerziellen Exemplar. Die Membran muss nach 10 Sterilisationsvorgängen beziehungsweise 10 Wochen Benutzung ausgetauscht werden, was dementsprechende Ausgaben bedeutet. Da der Reaktor mit einer Grundfläche von 0,25 m<sup>2</sup> lediglich 2 L Füllvolumen, dafür eine geringe Schichtdicke besitzt, können pro Quadratmeter nur 8 L kultiviert werden. Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen wäre gegebenenfalls eine gestapelte Anordnung der Reaktoren, um den verfügbaren Platz bestmöglich auszunutzen.

#### 4.3.5 Kultivierung von *Emiliana huxleyi* im semi-kontinuierlichen Betrieb

Die Versuche aus Kapitel 4.3 zeigen, dass die Massenkultivierung von *E. huxleyi* grundsätzlich möglich ist. Besonders der Bag- und Membranreaktor zeigten enormes Potential. Beide Reaktoren besitzen dabei unterschiedliche Vorteile: Der Bag-Reaktor zeigte die beste Coccolithenausbeute, während der Membranreaktor die höchste Zellzahl erzielte. Zur Annäherung an einen industriellen kontinuierlichen Prozesses, wurde eine semi-kontinuierliche Fahrweise etabliert. Diese reduziert unproduktive Zeiten in Form von Lag-Phasen und niedriger Biomasse. Zudem werden Medienlimitierungen und Adaption beziehungsweise Akklimatisation vermieden. Durch den Einsatz dieser Betriebsweise für beide Reaktoren sollten unterschiedliche Ziele erreicht werden. In der Versuchsreihe mit dem Bag-Reaktor sollte trotz regelmäßiger Verdünnung der Kultur ein stabiler Prozess erzeugt werden, wodurch eine möglichst hohe Coccolithenausbeute erzielt wird. Im Membranreaktor konnte beobachtet werden, dass zwar eine enorm hohe Zellzahl erreicht wurde, die Kalzifizierung jedoch herunter reguliert wurde. Da die Kultur zudem einen Farbwechsel aufwies und grün wurde, liegt die Vermutung nahe, dass die verwendete Lichtintensität nicht ausreichend war. So sollte in der folgenden Versuchsreihe die PFD stufenweise erhöht werden, um die Kalzifizierung zu unterstützen.

### 4.3.5.1 Bag-Reaktor

Abbildung 4.13 stellt zusammenfassend die Ergebnisse während der Kultivierung im Bag-Reaktor dar. Während der Kultivierung wurde keine Limitation an Phosphat beobachtet (siehe Anhang Kapitel 7.3.4, Abbildung 7.36).

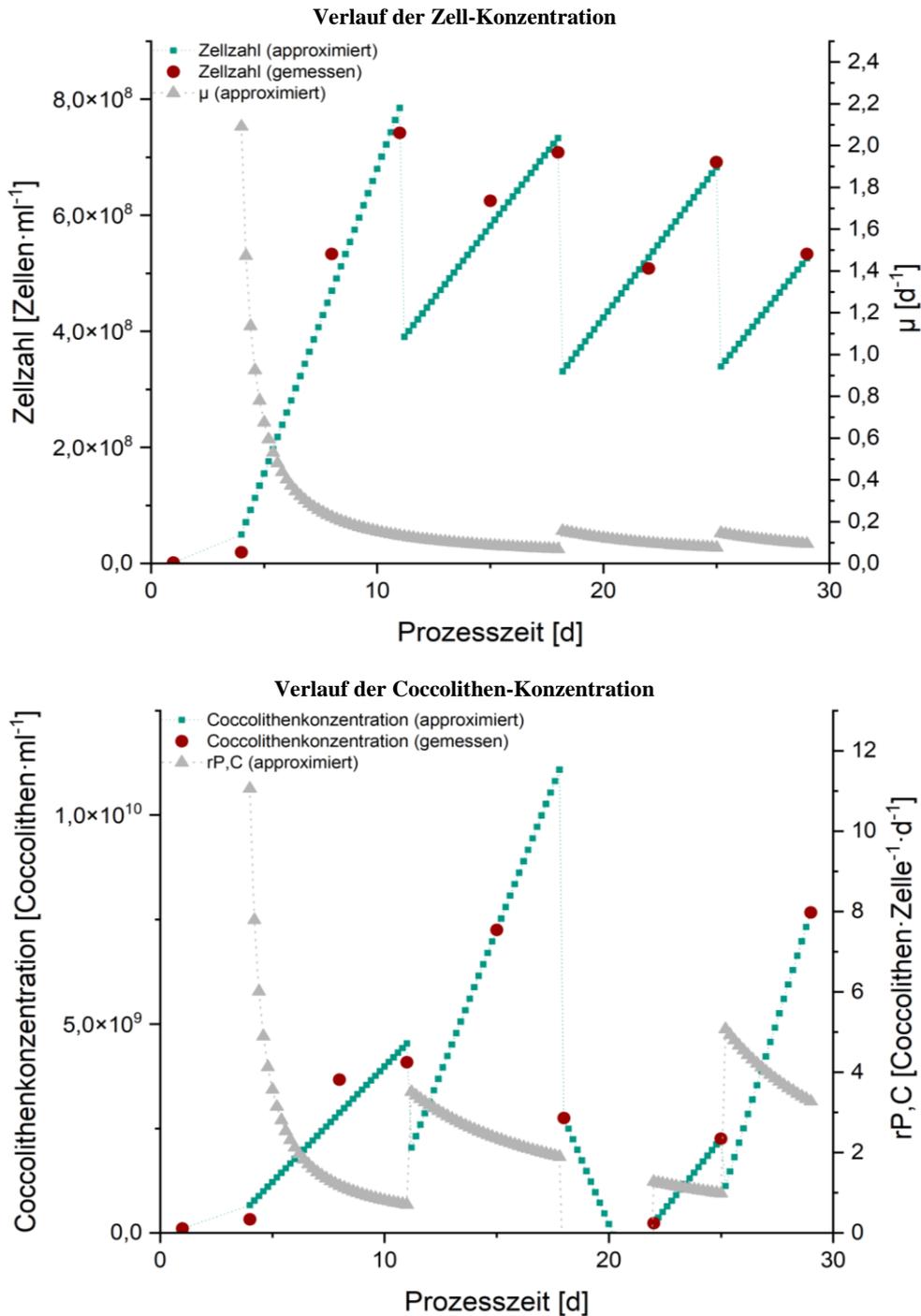


Abbildung 4.13: Oben: Verlauf der approximierten Zellzahl (grün), der gemessenen Zellzahl (blau) und der Wachstumsrate (grau). Unten: Verlauf der approximierten Coccolithen-Konzentration (grün), der gemessenen Coccolithen-Konzentration (blau) und der zellulären Coccolithen-Produktivität (grau)

An den Kultivierungstagen 11, 18 und 25 wurde etwa die Hälfte des Reaktorvolumens entnommen und durch frisches Medium ersetzt. An diesen Probenahme-Tagen reduziert sich die Biomassekonzentration entsprechend auf die Hälfte. Während der Phasen zeigt sich, wie zu erwarten, ein lineares Wachstum. Zur besseren Ermittlung der spezifischen Raten wurde diese anhand der linearen Ausgleichskurven ermittelt. Die gemittelte Wachstumsrate nach jeder Verdünnung des Reaktors liegt bei  $0,1 \text{ d}^{-1}$  und ist somit nur halb so hoch wie in den Versuchen aus Kapitel 4.3.2. Da dies jedoch bei wesentlich höheren Konzentrationen eintritt ist die volumetrische Coccolithen-Produktivität deutlich höher. Wie in dieser Arbeit in verschiedenen Versuchen beobachtet werden konnte, führen hohe Wachstumsraten scheinbar zu geringeren Coccolithen-Konzentrationen. Da die Wachstumsrate in dieser Versuchsreihe niedriger war, führte dies zur 1,7-fachen Coccolithen-Konzentrationen, verglichen zu den vorherigen Versuchen im Bag-Reaktor (Wert approximiert). Die Kultur produziert bis auf den Medienwechsel an Tag 18 weiterhin Coccolithen und dies mit äußerst hohen Raten im Bereich von  $1,11$  bis  $4,05 \text{ Coccolithen-Zelle}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ . Die maximal erreichte Coccolithenmasse war mit  $3,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  etwas geringer (siehe Kapitel 7.3.4, Abbildung 7.37). Die volumetrische Coccolithenproduktion liegt in der semi-kontinuierlichen Kultivierung bei  $0,3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  (im Vergleich von  $0,18 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  während der zweiten Kultivierung in Kapitel 4.3.2).

Dennoch führte die regelmäßige Ernte in Summe zu einer höheren Coccolithenausbeute bei derselben Kultivierungsdauer. So wurde in dieser Versuchsreihe eine Ausbeute von  $82 \text{ g}$  erreicht, während die Kultivierung aus Kapitel 4.3.2 eine Ausbeute von  $53 \text{ g}$  ergab. Dies ist ein großer Vorteil für zukünftige industrielle Anwendungen. Da in der Produktion, im Vergleich zum Batch-Betrieb, kein Stillstand auftritt, können die Betriebskosten gesenkt und höhere Raum-Zeit-Ausbeuten erreicht werden [11, 191]. So können in kurzer Zeit Coccolithenmengen im dreistelligen Gramm-Bereich erhalten werden.

### 4.3.5.2 Membranreaktor

Die folgende Abbildung 4.14 zeigt zusammenfassend die Ergebnisse während der semi-kontinuierlichen Kultivierung im Membranreaktor. Es kam zu keinem Zeitpunkt dieser Kultivierung zu einem vollständigen Verbrauch der Phosphatkonzentrationen (siehe Kapitel 7.3.4, Abbildung 7.36).

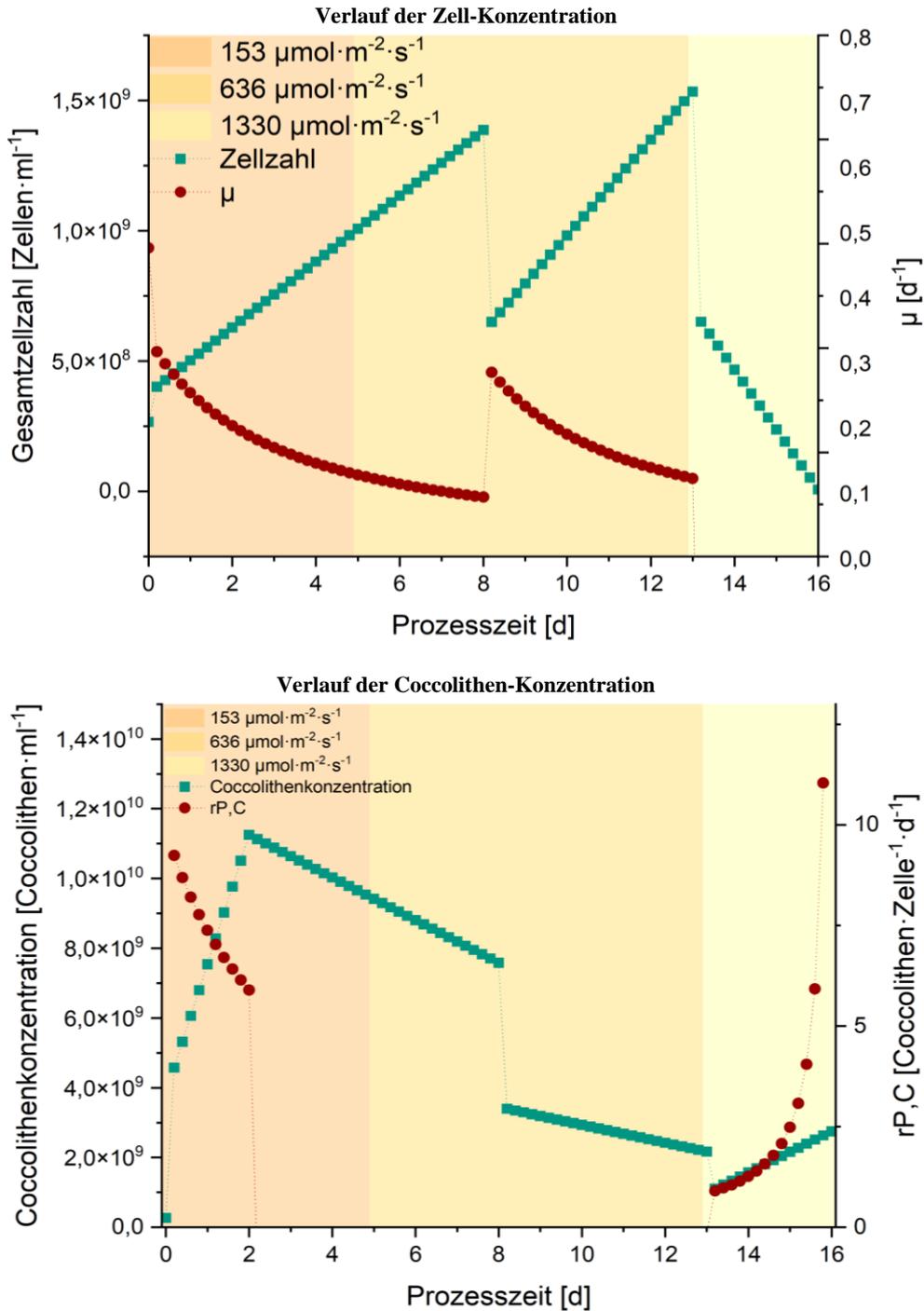


Abbildung 4.14: Oben: Verlauf der Zellzahl (grün) und der Wachstumsrate (blau). Unten: Verlauf der Coccolithen-Konzentration (grün) und der zellulären Coccolithen-Produktivität (blau). Die Erhöhung der PFD ist durch die verschiedenen Hintergrundfarben markiert

Während des Versuches im Membranreaktor wurden 900 ml der Kulturbrühe an Tag 8 und 13 entnommen und mit der äquivalenten Menge an frischem Medium ersetzt. Zudem wurde an Tag 5 und 13 die Lichtintensität erhöht. So wurde die Kultivierung mit einer PFD von  $153 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  begonnen und dann auf  $636 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  und  $1330 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  erhöht (markiert durch die Veränderung der Hintergrundfarben). Dieses Vorgehen scheint einen unterschiedlichen Einfluss auf das Wachstum und die Kalzifizierung auszuüben.

Bei der Verwendung einer PFD von  $153 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  wird eine maximale Zellzahl von  $1,0\cdot 10^9$  Zellen $\cdot\text{ml}^{-1}$  erreicht. Die gemittelte Photonenabsorptionsrate liegt bei  $3,6\cdot 10^{-6} \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{Zelle}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ . Wird die Lichtintensität auf  $636 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  gesteigert, so nimmt auch die Zellkonzentration zu, bis sie auf einen Wert von  $1,5\cdot 10^9$  Zellen $\cdot\text{ml}^{-1}$  steigt. Durch die Erhöhung der Lichtintensitäten kann einer Lichtlimitierung der Zellen entgegen gewirkt werden, die durch die steigenden Biomassekonzentrationen zwangsläufig entsteht [69]. Die gemittelte Photonenabsorptionsrate lag nun bei  $8,5\cdot 10^{-6} \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{Zelle}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ . Obwohl die Zellen nun fast die 2,5-fache Menge an Photonen erhalten, sind die gemittelten Wachstumsraten mit einem Wert von  $0,2 \text{ d}^{-1}$  gleich und befanden sich im selben Wertebereich, wie auch in den Kultivierungen aus Kapitel 4.3.4. Bei einer weiteren Steigerung der Lichtintensität auf  $1330 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  fallen die Zellzahl und die Wachstumsraten stetig ab. Die gemittelte Photonenabsorptionsrate stieg in dieser Phase auf  $2,6\cdot 10^{-4} \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{Zelle}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ . Ähnliche Ergebnisse, erhielt die Arbeitsgruppe von Hariskos et al. [76]. Sie zeigten eine positive Korrelation der Wachstumsrate und der PFD. Ab einer PFD von  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  zeigte der Stamm RCC1216 (entspricht Stamm CCMP3266) eine Lichtsättigung und es wurde eine maximale Wachstumsrate von  $0,9 \text{ d}^{-1}$  erreicht [76]. Ab einer Lichtintensität von  $800 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  war die Wachstumsrate nur noch etwa halb so hoch und sank mit steigender PFD weiter ab [76].

Wird der Verlauf der Coccolithen-Konzentration betrachtet, so scheint ein gegenteiliger Effekt stattzufinden. Bis Tag 2 kann eine Zunahme der Konzentration auf einen Wert von  $1,1\cdot 10^{10}$  Coccolithen $\cdot\text{ml}^{-1}$  verzeichnet werden. Dabei handelt es sich um die höchste Coccolithen-Konzentration, die jemals erreicht wurde. Die Coccolithen-Konzentration sinkt anschließend jedoch wieder ab. Diese Abnahme wird auch nicht durch die Erhöhung der PFD an Tag 5 oder durch den Medienwechsel an Tag 8 aufgehalten. Wird die PFD jedoch auf  $1330 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  erhöht, also auf die Lichtintensität, bei der kein Wachstum mehr stattfindet, so nimmt die Coccolithen-Konzentration und vor allem die zelluläre Coccolithen-Produktivität zu. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die Coccolithen zum Schutz vor zu hohen Lichtintensitäten gebildet werden könnten. So konnte Paasche [170] in seinen Versuchen zeigen, dass eine erhöhte Lichtintensität bei manchen *E. huxleyi*-Stämmen zu mehr Coccolithen pro Zelle führten. Die PFD lag jedoch im Bereich von  $8\text{-}330 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  und ist somit nicht vergleichbar mit denen aus diesem Versuch. Viele Arbeitsgruppen argumentieren jedoch gegen diese Theorie, da nicht-kalzifizierende Stämme Licht in gleicher oder höherer Intensität tolerieren können [76, 154, 173, 238]. Vielleicht ist die erhöhte Coccolithenbildung auch keine direkte Folge der Lichtintensität, sondern eine Fluchtstrategie der Coccolithophoren. Durch eine voll ausgebildete Coccosphäre erhöhen die Zellen ihre Dichte, wodurch sie schwerer als das Wasser werden und absinken. In den Ozeanen würde dies dazu führen, dass die Zellen in tiefere Wasserschichten mit geringeren Lichtintensitäten absinken. Dies würde vor schädlichen Lichteinflüssen wie der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und dem daraus resultierenden oxidativen Stress schützen [123, 211].

Dieser Versuch zeigt, dass die Kultur durch Anpassung der Lichtintensität zur Kalzifizierung angeregt werden kann. Es konnte erneut beobachtet werden, dass die Kalzifizierung bei einer Kultur mit hoher Wachstumsrate herunterreguliert wird. Die Erhöhung der Lichtintensität auf  $1330 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  führte zwar zu einem Absterben der Zellen, jedoch zu einer gesteigerten Coccolithenproduktion. So konnte während einer 16-tägigen Kultivierung eine Coccolithenausbeute von 8 g erreicht werden (siehe Kapitel 7.3.4, Abbildung 7.36).

# 5 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, die Kultivierbarkeit der Coccolithoporide *Emiliana huxleyi* zu optimieren, um möglichst hohe Coccolithenausbeuten zu erhalten. Durch die Tag-Nacht-Vorversuche im Schüttelkolben zeigte sich, dass eine hohe Wachstumsrate zu einem Einbruch der Kalzifizierungsrate führt. So wurden durch den Einsatz eines 15:9-Zyklus Zell-Konzentrationen von  $2,0 \cdot 10^8$  Zellen·ml<sup>-1</sup> mit einer Wachstumsrate von 0,9 d<sup>-1</sup> erreicht, während die Coccolithen-Konzentration lediglich bei einem Wert von  $4,2 \cdot 10^8$  Coccolithen·ml<sup>-1</sup> lag. Bei einer permanenten Beleuchtung mit  $220 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  hingegen lag die erreichte Zell-Konzentration bei  $1,4 \cdot 10^8$  Zellen·ml<sup>-1</sup>. Auch die Wachstumsrate war mit 0,6 d<sup>-1</sup> geringer, dennoch wurden Coccolithen-Konzentrationen von  $6,1 \cdot 10^8$  Coccolithen·ml<sup>-1</sup> erzielt. Diese Ergebnisse können durch mehrere Möglichkeiten erklärt werden: Zum einen kann die Zelle nicht simultan die Zellteilung und Coccolithenproduktion durchführen. Darüber hinaus teilen sich die Zellen bevorzugt in der Nacht, wenn sie keine Photosynthese betreiben können, um so kein Licht zu verlieren. Zellen unter permanenter Beleuchtung müssen während der Zellteilung die Photosynthese einstellen, was zu einem Photonenverlust für die Dauer der Mitose (~ 2 Stunden) führt. Ein weiterer Grund besteht darin, dass die Kalzifizierung einen enormen Energiebedarf besitzt, der scheinbar nur durch eine permanente Lichtverfügbarkeit zufriedenstellend gedeckt werden kann (siehe Kapitel 4.1). Aufgrund des Rückgangs der Kalzifizierungsrate und der Tatsache, dass die verwendeten Photobioreaktoren dieser Arbeit nicht abgeschirmt werden können, wurden die Hell-Dunkel-Zyklen in dieser Arbeit nicht weiter eingesetzt. Ein zweistufiges Verfahren hätte jedoch großes Potential. So könnte in einer ersten Phase die Zellzahl durch den Einsatz der Zyklen gesteigert werden. In einer zweiten Phase könnte auf eine permanente Beleuchtung gewechselt werden, wodurch die Coccolithenproduktion angeregt und die Ausbeute erhöht werden könnte.

Das verwendete ESAW-Medium simuliert in seiner Nährstoffzusammensetzung natürliches Meerwasser mit nur leicht erhöhten Werten für die Makroelemente. Dies führt dazu, dass die enthaltenen Elemente für eine Massenkultivierung mit hohen Zell- und Coccolithen-Konzentrationen zu gering dosiert sind. So wurden in dieser Arbeit schrittweise alle Elemente des Mediums erhöht (siehe Kapitel 4.2.2). Nach insgesamt sechs Modifikationsansätzen konnte so die Zellzahl sukzessiv auf einen Wert von  $3,0 \cdot 10^8$  Zellen·ml<sup>-1</sup> erhöht werden, was im Vergleich zu dem unveränderten Medium fast einer Vervierfachung der Ausgangskonzentration entspricht. Auch die Coccolithen-Konzentration zeigte eine massive Steigerung. So konnte im letzten Modifikationsansatz eine Konzentration von  $1,9 \cdot 10^9$  Coccolithen·ml<sup>-1</sup> erreicht werden, was einer Steigerung um das sechsfache entspricht.

Mit diesem modifizierten ESAW-Medium wurden anschließend Kultivierungen in vier verschiedenen Photobioreaktoren durchgeführt. Dabei handelte es sich um zwei für *E. huxleyi* bereits beschriebene aber nicht optimierte Reaktortypen (Rührkessel- und Bag-Reaktor) sowie zwei bisher nicht publizierte (Schlauch- und Membranreaktor) Systeme. Die Reaktoren unterschieden sich in ihrer Begasungsart (Oberflächen-, Membran oder Blasenbegasung), ihrer Durchmischung (durch Wellen, Begasung oder Rührelemente), ihrem Reaktorvolumen (1,6-14 L) und ihrer Geometrie. Alle Kultivierungen wurden mit folgenden Prozessparametern durchgeführt: T: 19 °C, pH: 8,

$p_{\text{CO}_2}$ : 1%, vvm: 0,05 und PFD:  $350 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Die Ergebnisse zeigen, dass der Rührkesselreaktor von allen Systemen das ungeeignetste für die Kultivierung von *E. huxleyi* ist. Es kam zu starken Zellablagerungen, welche in Folge zu geringen Zell- und Coccolithen-Konzentrationen führten. Zudem ist der Scherstress durch die verbauten Rührer sehr hoch. Da *E. huxleyi* gegenüber mechanischer Belastung als empfindlich gilt, ist anzunehmen, dass dies ebenfalls die Ergebnisse negativ beeinflusste.

Die Zell-Konzentration im Schlauchreaktor schien durch die Blasenbegasung positiv beeinflusst worden zu sein. Mit einer Wachstumsrate von  $0,3 \text{ d}^{-1}$  erreicht dieses System den höchsten Wert. Wie bereits erwähnt wurde, führte das gute Wachstum auch hier dazu, dass in dieser Kultur keine Coccolithenproduktion stattfand. Wenn zukünftig ein Mechanismus entschlüsselt werden könnte, um die Coccolithenproduktion gezielt anzuregen, so besäße der Schlauchreaktor großes Potential. Davon ausgehend, dass jede Zelle 10-15 Coccolithen produzieren würde, so könnten mit einem theoretischen Coccolithengewicht von 2,5 pg Ausbeuten von bis zu 14 kg in 14 L erreicht werden [93, 241]. Dennoch könnte der Schlauchreaktor auch ohne Coccolithenproduktion industrielles Potential besitzen. So kann *E. huxleyi* je nach Lichtbedingungen einen Fucoxanthin-Gehalt von  $0,011\text{-}0,028 \text{ pg}\cdot\text{Zelle}^{-1}$  erreichen [205]. Dies würde im Idealfall zu einer Ausbeute von  $10,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  führen. Fucoxanthin kann als Nahrungsergänzungsmittel eingenommen werden und soll die Fettreduktion unterstützen [129]. Bei einer Dosierung von 5 mg Fucoxanthin pro Tablette mit einem Stückpreis von 30 Cents, könnte die Kultur im Schlauchreaktor einen Gewinn von 86 € erzielen (Berechnungen anhand der Angaben des Produktes Fucoxanthin der Firma Kos, Stand 2023). Für den Einsatz als Chlorophyll-Tabletten könnten zusätzlich 26 € erwirtschaftet werden (Berechnungen anhand der Angaben des Produktes Chlorophyll Tabletten der Firma Hirundo Products, Stand 2023). Allerdings sind die Kosten der Kultivierung deutlich höher. Dazu zählt die einmalige Anschaffung der Phytobags mit einem Kaufpreis von 240 €. Die Kosten des Mediums liegen insgesamt bei 17 € (Berechnungen anhand der Chemikalienpreise der Carl Roth GmbH & Co. KG). Der Strompreis der Beleuchtung beträgt für die Kultivierung 123 € (96 LEDs, 6 W und einem Strompreis von 28,7 Cents pro kWh, Stand 2023). Bei einer großskaligen Produktion würden die Kosten wesentlich niedriger liegen, wie es die Erfahrungen bei größeren Anlagen im ha-Bereich zeigen. Dies würde durch eine Anpassung der maschinellen Produktion der Phytobags und der Verwendung natürlicher oder angepasster Beleuchtung erreicht werden.

Die besten Ergebnisse erreichen die Kultivierungen im Bag- und Membranreaktor. Die Versuche im Bag-Reaktor zeigen, dass trotz der hohen Schichtdicke eine gute Zellzahl und vor allem Coccolithen-Ausbeuten im Bereich von etwa  $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  erreicht werden. Auch der Membranreaktor zeigte zu Beginn der Kultivierung eine gute Kalzifizierung. Diese brach jedoch ein, sobald die Zellzahl einen Wert von  $3,4\cdot 10^8 \text{ Zellen}\cdot\text{ml}^{-1}$  überschritt und die Kulturbrühe mutmaßlich zu dicht wurde. Die Zellzahl stieg jedoch weiter auf einen Wert von  $4,3\cdot 10^9 \text{ Zellen}\cdot\text{ml}^{-1}$  an und erreichte damit die höchste Zellzahl aller Versuche. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurden beide Reaktoren für eine semi-kontinuierliche Kultivierung eingesetzt. Dort zeigte sich, dass die Kultivierung im Bag-Reaktor trotz regelmäßiger Volumenentnahme stabil über einen längeren Zeitraum lief und eine enorme Coccolithenausbeute von insgesamt 82 g erreichte. Während der Kultivierung im Membranreaktor wurde die Photonenflussdichte stufenweise erhöht, um einer Lichtlimitierung entgegen zu wirken. Durch dieses Verfahren konnte über den gesamten Kulti-

vierungsverlauf eine Coccolithenproduktion beobachtet werden, wodurch eine Coccolithenausbeute von insgesamt 8 g erreicht werden konnte. Somit waren in beiden Kultivierungen die Coccolithenausbeuten höher als die, die jemals in der Literatur erreicht wurden. Auch wenn die Produktion der Coccolithen noch immer sehr kostspielig ist, konnte diese Arbeit eine Grundlage für zukünftige Kultivierungen im industriellen Maßstab liefern.

Das Ziel der Arbeit, eine Produktion im Pilot-Maßstab zu etablieren wurde erreicht. So können für verschiedene Anwendungen zumindest zu Testzwecken Coccolithen-Mengen in kg-Maßstab produziert werden. Zusätzlich wurde ein medizinisches Einsatzgebiet der Coccolithen untersucht. So wurden die Coccolithen aus der ersten Kultivierung im Bag-Reaktor aufgereinigt und an das Institut für Anatomie und Zellbiologie des Universitätsklinikum der RWTH Aachen versandt. Unter der Leitung von Dr. Mersedeh Tohidnezhad wurde dort an dem Einsatz der Coccolithen als Knochenersatzmaterial geforscht (Daten noch nicht veröffentlicht). Dabei konnte beobachtet werden, dass eine Coccolithen-Konzentration von  $0,1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  die Viabilität der Zellen der MC3T3-E1-Osteoblasten-Zelllinie im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nicht negativ beeinflusst. Zudem konnte ein Anstieg des Runx2-Transkriptionsfaktors beobachtet werden. Dieser Faktor spielt eine wichtige Rolle bei der osteoblastären Differenzierung. Allerdings konnte eine verringerte alkalische Phosphatase-Aktivität (ALP) gemessen werden. Bei der ALP handelt es sich um einen Knochenmarker, der bereits in einem frühen Stadium des Knochenstoffwechsels nachgewiesen werden kann. Auch die Färbung mit Alizarin Red, zum Nachweis von Calciumablagerungen, zeigte keine Unterschiede. Diese Ergebnisse zeigen, dass es keinen eindeutig negativen - aber auch keinen positiven Einfluss der Coccolithen auf die Osteoblastenzellen gibt. Dies würde grundsätzlich den Einsatz der Coccolithen als Knochenersatzmaterial nicht ausschließen, sondern lediglich Modifikationen wie beispielsweise ein Beschichten der Coccolithen mittels Tissue-Engineering erfordern [157].

Die möglichen Einsatzgebiete der Coccolithen scheinen grenzenlos zu sein. Auch wenn diese Arbeit nicht die Lösung einer wirtschaftlichen Produktion von Coccolithen hervorbringt, so kann sie zukünftigen Forschern als Stütze auf dem Weg dorthin dienen.



## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Berges, J. A., Franklin, D. J., and Harrison, P. J. 2001. EVOLUTION OF AN ARTIFICIAL SEAWATER MEDIUM: IMPROVEMENTS IN ENRICHED SEAWATER, ARTIFICIAL WATER OVER THE LAST TWO DECADES. *Journal of Phycology* 37, 6, 1138–1145.
- [2] Jakob, I., Chairpoulou, M. A., Vučak, M., Posten, C., and Teipel, U. 2017. Biogenic calcite particles from microalgae-Coccoliths as a potential raw material. *Engineering in life sciences* 17, 6, 605–612.
- [3] Jakob, I., Weggenmann, F., and Posten, C. 2018. Cultivation of *Emiliana huxleyi* for coccolith production. *Algal Research* 31, 47–59.
- [4] Rosello Sastre, R., Csögör, Z., Perner-Nochta, I., Fleck-Schneider, P., and Posten, C. 2007. Scale-down of microalgae cultivations in tubular photo-bioreactors--a conceptual approach. *Journal of biotechnology* 132, 2, 127–133.



# 7 Anhang

## 7.1 Studentische Abschlussarbeiten

**Ole Bajohr** (2020): Einfluss von Hell-Dunkel-Phasen auf das Wachstum von *Emiliana huxleyi*

**Yang-Yang Tim Wang** (2020): Optimierung des Wachstumsverhaltens von *Emiliana huxleyi* im Photobioreaktor durch den Einsatz von Hell-Dunkel-Zyklen

**Jamila Boughanmi** (2020): Optimierung des Wachstums von *Emiliana huxleyi* durch Variation der Medienzusammensetzung

**Luka Blümling** (2021): Optimierung des Wachstums von *Emiliana huxleyi* durch Variation der Eisenkonzentration im Medium

**Melissa Ditzel** (2021): Einfluss von Hell-Dunkel-Phasen auf das Wachstum eines nicht kalzifizierenden *Emilianina huxleyi* Stammes

**Samiye Gündüz** (2021): Optimierung des Wachstums von *Emiliana huxleyi* durch Variation der Magnesiumkonzentration im Medium

**Vasco Welter** (2021): Entwicklung einer Fed-Batch-Prozessstrategie für die Kultivierung von *Emiliana huxleyi*

**Anastassia Trikin** (2021): Optimierung der Kultivierung der Kalkalge *Emiliana huxleyi* in verschiedenen Photobioreaktoren

## 7.2 Material und Methoden

### 7.2.1 Verwendete Geräte und Kits

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), Promega Corp. (Madison, USA), Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA) oder VWR International LLC (Radnor, USA) erworben [22].

Tabelle 7.1: Auflistung aller verwendeten Geräte und Assays

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Model/Artikelnummer</b>
Abgasanalysator	Sick Maihak AG Deutschland	Multor 610
Analysewaage	Kern & Sohn GmbH Deutschland	ABJ 320-4NM
Autoklav	SHP Steriltechnik AG, Deutschland	Laboklav ECO
Bag-Reaktor	Satorius Deutschland	20 L STD Flexboy (Sartopore/OPTA)
Calcium-Test	Merck KgaA Deutschland	1.14815.0001
Calcium-Test	Salifert Niederlande	Ca Profi Test
Inkubator	Flohr Instruments Niederlande	MKK 1200
Kühlaggregat	Huber Deutschland	Unichiller UC022
Lichtmikroskop	Zeiss Deutschland	Axio Scope.A1
Lichtsensoren	LI-COR Biosciences Corp., USA	LI-190SA mit LI-250 Lichtmeter
Lebensmittelfarbe	Wilton USA	leaf green
LED-Mantel	KIT-Entwicklung Deutschland	-
LED-Modul	KIT-Entwicklung Deutschland	-
LED-Panel	KIT-Entwicklung Deutschland	-
Massen-Durchflussregler	MKS Instruments Inc USA	MKS 1179B01311CSA MKS 1179B01312CSA
Membranreaktor	CellDeg Deutschland	HDC 1.1500, Model T

Nitrat-Standardlösung	Merck KgaA Deutschland	Certipur
Nitrat-Test	Supelco Deutschland	Nitrat-Test in Seewasser 1.14942.0001
Phosphat-Test	Supelco Deutschland	Phosphat Test 1.14848.0001
Photometer	PerkinElmer USA	UV/VIS Spectrometer Lambda 35
pH-Sonde	Hamilton Company USA	PolyLite Plus Arc 225
pO <sub>2</sub> -Sonde	Hamilton Company USA	Visiferm DO Arc 120
Rotationsschüttler	KS 501 digital Deutschland	IKA Werke GmbH
Rührkesselreaktor	BioEngineering Schweiz	KLF 2000
Schlauchreaktor	Phytolutions GmbH	Phytobags
Seifenblasen-Durchfluss- messer	Sensidyne LP. USA	Gilian Gilibrator-2
Sterilbank	Fisher Scientific GmbH, Deutschland	Thermo Scientific™ Safe 2020
Trockenschrank	Memmert Deutschland	Gilian Gilibrator-2
Vortex	Bender & Hobein AG Schweiz	Vortex-Genie 2
Zentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Deutschland	ROTINA 420R

## 7.2.2 ESAW-Medium

## ESAW-Medium für die Stammhaltung

Tabelle 7.2: Zusammensetzung des ESAW-Mediums nach [6, 17]

## Salzlösung I - Wasserfreie Salze

Komponente	Einwaage [g·L <sup>-1</sup> ]	Konzentration im Medium [mM]
NaCl	21,1900	362,60
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3,5500	25,00
KCl	0,5990	8,04
NaHCO <sub>3</sub>	0,1740	2,07
KBr	0,0863	725·10 <sup>-3</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,0230	372·10 <sup>-3</sup>
NaF	0,0028	65,7·10 <sup>-3</sup>

## Salzlösung II - Hydrate

Komponente	Einwaage [g·L <sup>-1</sup> ]	Konzentration im Medium [mM]
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	9,5920	47,18
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1,3440	9,14
SrCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,0218	82·10 <sup>-3</sup>

## Stocklösungen

	Komponente	Einwaage [g·L <sup>-1</sup> ]	Konzentration im Medium [mM]	Zugabe [ml]
1 - Nitrat	NaNO <sub>3</sub>	46,7	549,5·10 <sup>-3</sup>	1
2 - Phosphat	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	3,09	22,4·10 <sup>-3</sup>	1
3 - Silikat	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O	11,2	106·10 <sup>-3</sup>	2
4 - Eisen	FeEDTA	2,408	7,00·10 <sup>-3</sup>	1
5 - Spurenelemente	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,073	254·10 <sup>-6</sup>	1
	CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,016	5,69·10 <sup>-6</sup>	
	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,409	2,42·10 <sup>-3</sup>	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1,48·10 <sup>-3</sup>	6,1·10 <sup>-6</sup>	
	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	1,73·10 <sup>-4</sup>	1·10 <sup>-6</sup>	
	NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,49·10 <sup>-3</sup>	6,3·10 <sup>-6</sup>	
6 - Vitamine	Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	3,09	8,29·10 <sup>-3</sup>	1
	Thiamin·HCl	0,1	297·10 <sup>-6</sup>	
	Biotin	0,002	4,09·10 <sup>-6</sup>	
	B <sub>12</sub>	0,001	1,47·10 <sup>-6</sup>	

Die Salzlösungen I und II werden zusammen gelöst. Anschließend werden jeweils von den Stocklösungen 1, 2, 3 und 4 1 ml in das Salzlösungsgemisch gegeben. Von der Stocklösung 3 werden 2 ml hinzugegeben. Die Mischung wird dann auf 1 L aufgefüllt und autoklaviert. Währenddessen wird die Stocklösung 6 steril filtriert. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf Raumtemperatur wird 1 ml der Vitaminlösung in das Medium gegeben und gut gemischt.

## ESAW-Medium für die Reaktorkultivierungen

### Erster Optimierungsversuch

Tabelle 7.3: Medium für die Kultivierungen in den Reaktoren

<b>Salzlösung I - Wasserfreie Salze</b>				
Komponente	1. Optimierung		2. Optimierung	
	Einwaage [g·L <sup>-1</sup> ]	Konzentration im Medium [mM]	Einwaage [g·L <sup>-1</sup> ]	Konzentration im Medium [mM]
NaCl	21,1900	315,30	21,1900	315,30
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3,5500	21,73	7,1000	43,47
KCl	0,5990	6,99	1,1980	13,97
NaHCO <sub>3</sub>	0,1740	1,80	-	-
KBr	0,0863	6,31·10 <sup>-1</sup>	0,1726	1,26
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,0230	3,23·10 <sup>-1</sup>	0,046	6,47·10 <sup>-1</sup>
NaF	0,0028	5,80·10 <sup>-2</sup>	0,0056	1,16·10 <sup>-1</sup>

<b>Salzlösung II - Hydrate</b>				
Komponente	1. Optimierung		2. Optimierung	
	Einwaage [g·L <sup>-1</sup> ]	Konzentration im Medium [mM]	Einwaage [g·L <sup>-1</sup> ]	Konzentration im Medium [mM]
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	9,592	41,03	19,1840	82,05
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1,344	7,95	12,6880	15,90
SrCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,0218	7,11·10 <sup>-2</sup>	0,0436	1,42·10 <sup>-1</sup>

<b>Stocklösungen</b>				
	Komponente	Einwaage [g·L <sup>-1</sup> ]	Konzentration im Medium [mM]	Zugabe [ml]
1 - Nitrat	NaNO <sub>3</sub>	46,7	11,95	25
2 - Phosphat	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	3,09	0,49	25
3 - Silikat	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O	11,2	1,15	25
4 - Eisen	FeEDTA	2,408	6,09·10 <sup>-3</sup>	1
5 - Spurenelemente	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,073	5,52·10 <sup>-3</sup>	25
	CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,016	1,24·10 <sup>-3</sup>	
	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,409	5,26·10 <sup>-2</sup>	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1,48x10 <sup>-3</sup>	1,33·10 <sup>-4</sup>	
	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	1,73x10 <sup>-4</sup>	2,17·10 <sup>-5</sup>	
	NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,49x10 <sup>-3</sup>	1,28·10 <sup>-4</sup>	
	Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	3,09	1,80·10 <sup>-1</sup>	
6 - Vitamine	Thiamin·HCl	0,1	6,45·10 <sup>-3</sup>	50
	Biotin	0,002	1,78·10 <sup>-4</sup>	
	B <sub>12</sub>	0,001	1,60·10 <sup>-5</sup>	

Die Salzlösungen I und II wurden zusammen gelöst. Anschließend wird 1 ml der Stocklösung 4 zugegeben und das Gemisch wurde auf 1 L aufgefüllt. Der Mediumansatz sowie die Stocklösungen 1, 2, 3 und 5 werden dann autoklaviert. Danach werden jeweils 25 ml dieser Stocklösung in das Salzlösungs-Gemisch gegeben. Zuletzt werden 50 ml der sterilfiltrierten Vitaminlösung (6) zugegeben.

### ESAW-Medium zum Nachfüttern der Reaktoren

Tabelle 7.4: Zusammensetzung des Mediums zum nachfüllen der Reaktoren

#### Salzlösung I - Wasserfreie Salze

Komponente	Einwaage [g·L <sup>-1</sup> ]	Konzentration im Medium [mM]
NaCl	21,1900	315,30
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	14,2	86,93
KCl	2,396	27,95
KBr	0,3452	2,52
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,092	1,29
NaF	0,0112	2,32·10 <sup>-1</sup>

#### Salzlösung II - Hydrate

Komponente	Einwaage [g·L <sup>-1</sup> ]	Konzentration im Medium [mM]
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	38,368	164,11
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	5,376	31,80
SrCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,0872	0,28

#### Stocklösungen

	Komponente	Einwaage [g·L <sup>-1</sup> ]	Konzentration im Medium [mM]	Zugabe [ml]
1 - Nitrat	NaNO <sub>3</sub>	46,7	11,95	25
2 - Phosphat	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	3,09	0,49	25
3 - Silikat	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O	11,2	1,15	25
4 - Eisen	FeEDTA	2,408	6,09·10 <sup>-3</sup>	1
5 - Spurenelemente	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,073	5,52·10 <sup>-3</sup>	25
	CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,016	1,24·10 <sup>-3</sup>	
	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,409	5,26·10 <sup>-2</sup>	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1,48x10 <sup>-3</sup>	1,33·10 <sup>-4</sup>	
	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	1,73x10 <sup>-4</sup>	2,17·10 <sup>-5</sup>	
	NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,49x10 <sup>-3</sup>	1,28·10 <sup>-4</sup>	
	Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	3,09	1,80·10 <sup>-1</sup>	
6 - Vitamine	Thiamin·HCl	0,1	6,45·10 <sup>-3</sup>	50
	Biotin	0,002	1,78·10 <sup>-4</sup>	
	B <sub>12</sub>	0,001	1,60·10 <sup>-5</sup>	

Die Salzlösungen I und II wurden zusammen gelöst. Anschließend wird 1 ml der Stocklösung 4 zugegeben und das Gemisch wurde auf 1 L aufgefüllt. Der Mediumansatz sowie die Stocklösungen 1, 2, 3 und 5 werden dann autoklaviert. Danach werden jeweils 25 ml dieser Stocklösung in das Salzlösungs-Gemisch gegeben. Zuletzt werden 50 ml der sterilfiltrierten Vitaminlösung (6) zugegeben.

## Konzentrationsveränderungen aller Elemente des ESAW-Medium während der Modifikation

Tabelle 7.5: Änderung aller Elementkonzentration während der Modifizierungsversuche des ESAW-Mediums. Alle Angaben sind in mg·L<sup>-1</sup>. Die Bezeichnung der Ansätze entspricht denen, wie sie in Kapitel 3.3.3 in Tabelle 3.3 zusammengefasst sind

	Meerwasser		ESA W	1		2			3			4		5		6		7	
	[10]	[46]		NaNO <sub>3</sub>	NH <sub>4</sub> Cl	25x	50x	100x	5x	10x	20x	1x	50x	5x	25x	5x	25x	2x	4x
<b>Mg</b>	1300	1312	1147	1147	1147	1043	956	819	1062	989	869	1066	1019	1015	997	1015	997	1994	3989
<b>S</b>	935	307	802	802	802	731	672	579	743	692	609	747	715	712	699	712	699	1396	2790
<b>Ca</b>	431	422	367	367	367	333	305	262	339	316	278	341	326	324	318.7	324	319	637	1275
<b>K</b>	410	409	343	343	343	311	285	245	317	295	260	318	279	303	273	303	298	596	1191
<b>Br</b>	72	69	58	58	58	53	48	41	54	50	44	54	52	51	50	51	50	101	202
<b>N</b>	0,1	0,1	8	8	8	181	186	568	180	335	588	184	177	177	177	176	173	173	173
<b>Sr</b>	8	8	7	7	7	7	6	5	7	6	5	8	6	6	6	6	6	13	25
<b>B</b>	4,6	1	4	4	4	4	3	3	4	4	3	4	4	4	4	4	4	7	14
<b>Si</b>	3	1	3	3	3	3	3	2	3	3	2	3	3	3	3	7	32	32	32
<b>F</b>	1,3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	4
<b>P</b>	0,01	0,02	0,7	0,7	0,7	16	29	50	16	30	53	16	15	15	15	15	15	15	15
<b>Fe</b>	-	2·10 <sup>-5</sup>	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,4	0,3	1,7	8,5	0,3	0,3	0,3	0,3
<b>Mn</b>	-	2·10 <sup>-5</sup>	0,1	0,1	0,1	3,0	5,5	9,5	0,6	1,1	2,0	3,1	3,0	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9
<b>Zn</b>	-	4·10 <sup>-4</sup>	0,02	0,02	0,02	0,4	0,7	1,2	0,1	0,1	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
<b>Co</b>	-	7·10 <sup>-7</sup>	3·10 <sup>-3</sup>	3·10 <sup>-3</sup>	3·10 <sup>-3</sup>	0,1	0,1	0,2	0,02	0,03	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
<b>Mo</b>	0,01	0,01	6·10 <sup>-4</sup>	6·10 <sup>-4</sup>	6·10 <sup>-4</sup>	0,01	0,024	0,042	0,003	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
<b>Ni</b>	-	5·10 <sup>-4</sup>	4·10 <sup>-4</sup>	4·10 <sup>-4</sup>	4·10 <sup>-4</sup>	0,008	0,014	0,025	0,002	0,003	0,005	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008
<b>Se</b>	-	2·10 <sup>-4</sup>	8·10 <sup>-5</sup>	8·10 <sup>-5</sup>	8·10 <sup>-5</sup>	0,002	0,003	0,006	0,0004	0,001	0,001	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002

## 7.3 Ergebnisse

### 7.3.1 Einsatz von Hell-Dunkel-Zyklen

#### Schüttelkolbenversuche - Wachstum und Kalzifizierung

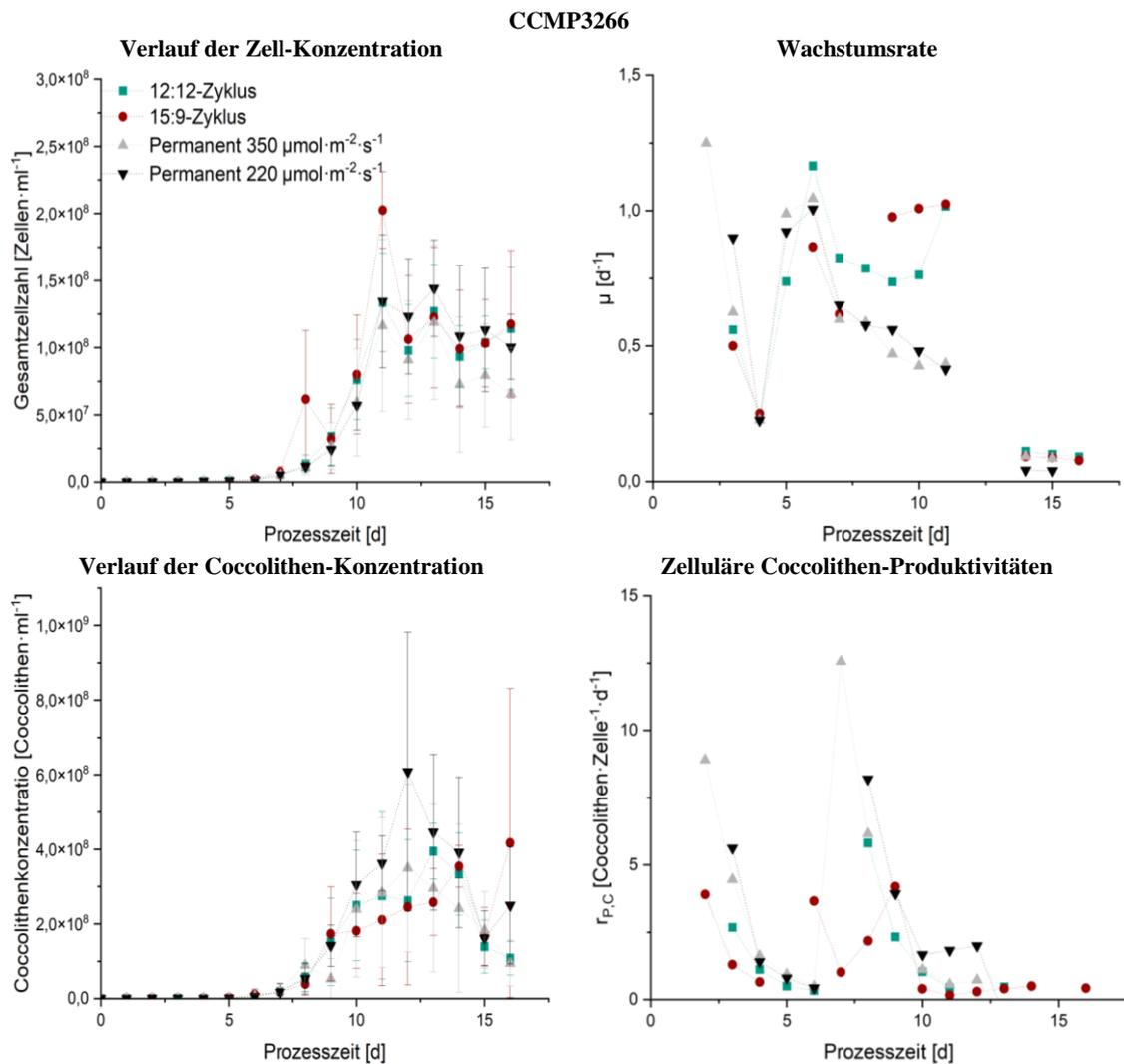


Abbildung 7.1: Links: Verlauf der Zellzahl (oben) und Coccolithen-Konzentration (unten) während der Kultivierung unter vier verschiedenen Lichtbedingungen mit dem Stamm CCMP3266. Rechts: Verlauf der Wachstumsrate  $\mu$  (oben) und zellulären Coccolithen-Produktivitäten (unten)

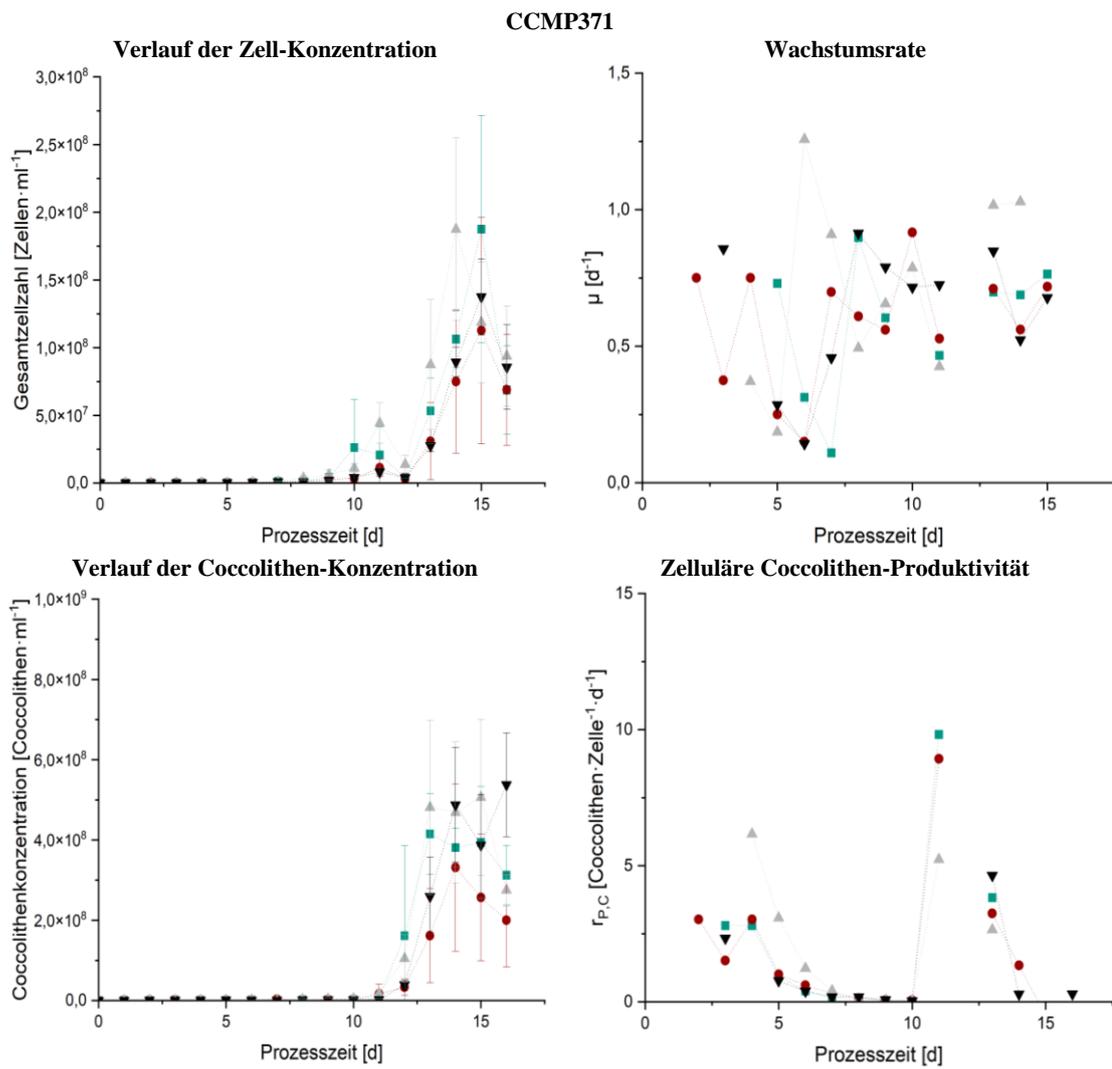


Abbildung 7.2: Links: Verlauf der Zellzahl (oben) und Coccolithen-Konzentration (unten) während der Kultivierung unter vier verschiedenen Lichtbedingungen mit dem Stamm CCMP371. Rechts: Verlauf der Wachstumsrate  $\mu$  (oben) und zelluläre Coccolithen-Produktivität (unten)

## Schüttelkolbenversuche - Nährstoffverbrauch

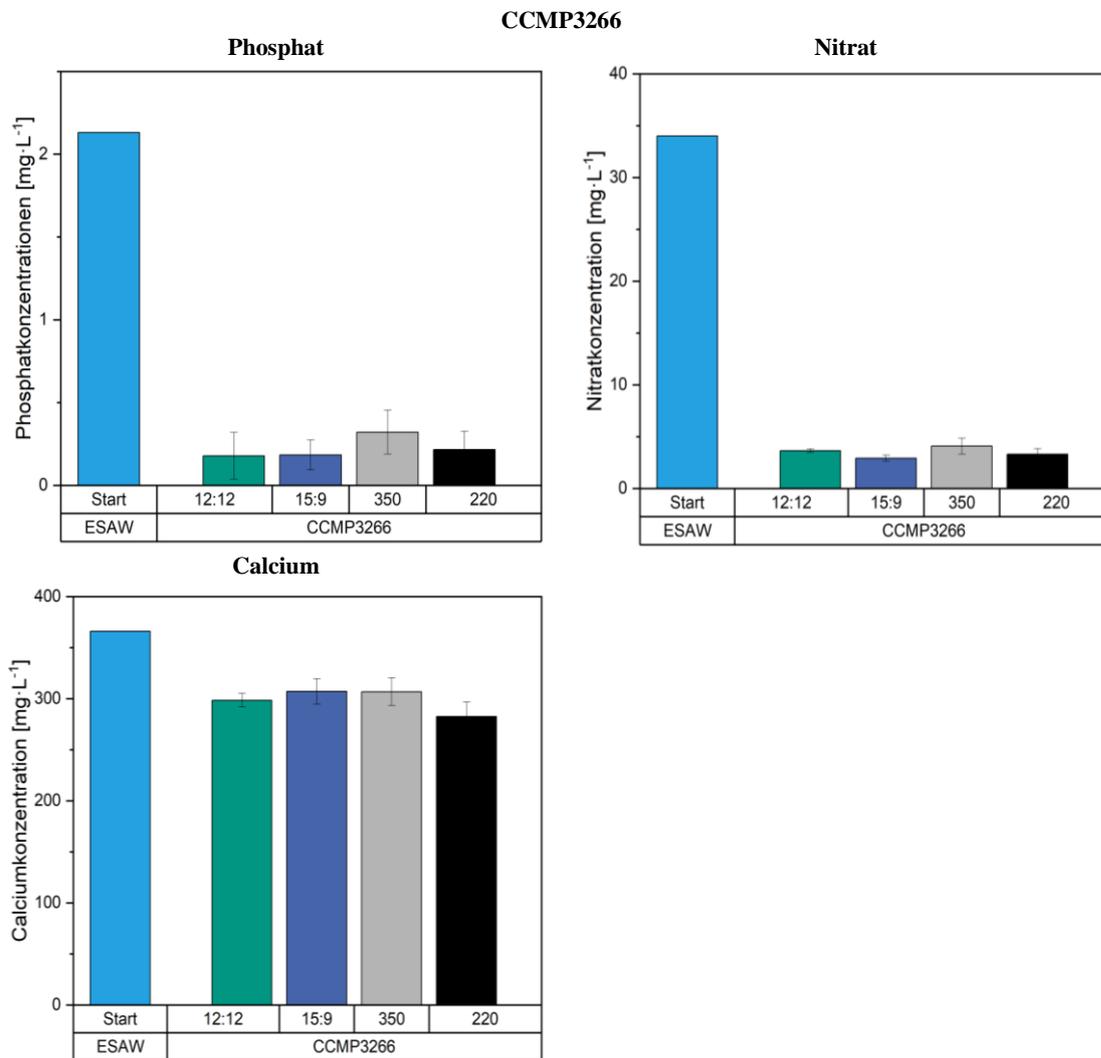


Abbildung 7.3: Startkonzentration im ESAW-Medium (Balken links) und Endkonzentrationen an Phosphat, Nitrat und Calcium während der Kultivierung des Stammes CCMP3266 bei verschiedenen Lichtbedingungen

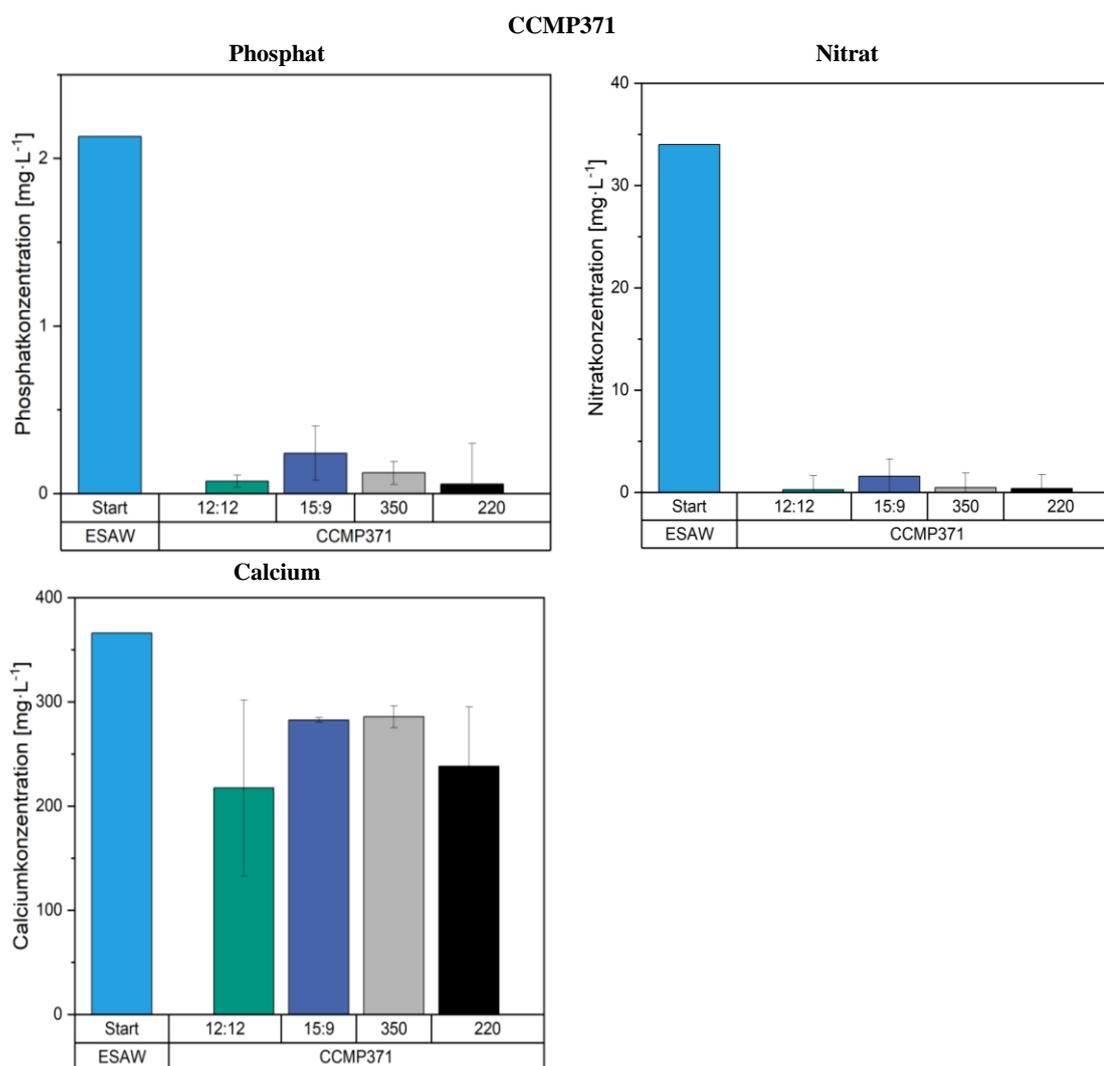


Abbildung 7.4: Startkonzentration im ESAW-Medium (Balken links) und Endkonzentrationen an Phosphat, Nitrat und Calcium während der Kultivierung des Stammes CCMP371 bei verschiedenen Lichtbedingungen

Tabelle 7.6: Zusammenfassung des Nährstoffverbrauches der kalzifizierenden Stämme

<b>CCMP3266</b>				
	<b>12:12</b>	<b>15:9</b>	<b>350</b>	<b>220</b>
Phosphatverbrauch [mg·L <sup>-1</sup> ]	2	1,9	1,8	1,9
Nitratverbrauch [mg·L <sup>-1</sup> ]	30,4	31,1	29,9	30,7
Calciumverbrauch [mg·L <sup>-1</sup> ]	67,5	58,9	59,2	83,5
<b>CCMP371</b>				
Phosphatverbrauch [mg·L <sup>-1</sup> ]	2,1	1,9	2,0	2,1
Nitratverbrauch [mg·L <sup>-1</sup> ]	33,7	32,4	33,5	33,6
Calciumverbrauch [mg·L <sup>-1</sup> ]	148,7	83,4	80,0	127,9

### Schüttelkolbenversuche – Anteil an nicht-kalzifizierten Zellen

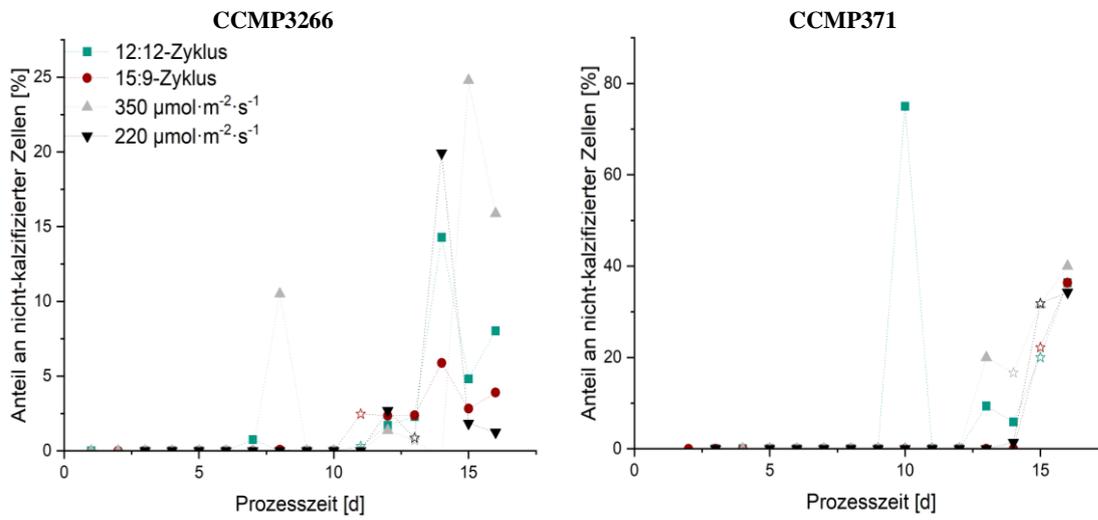


Abbildung 7.5: Anteil an nicht-kalzifizierten Zellen während der Kultivierung bei unterschiedlichen Lichtregimen des Stammes CCMP3266 (links) und CCMP371 (rechts). Die Sterne markieren den Kultivierungstag, der die höchste Zellkonzentration erreicht hat



Abbildung 7.6: Zellen des Stammes CCMP3266 ohne Coccolithen

## Schüttelkolbenversuche – Der nicht-kalzifizierende Stamm RCC1217

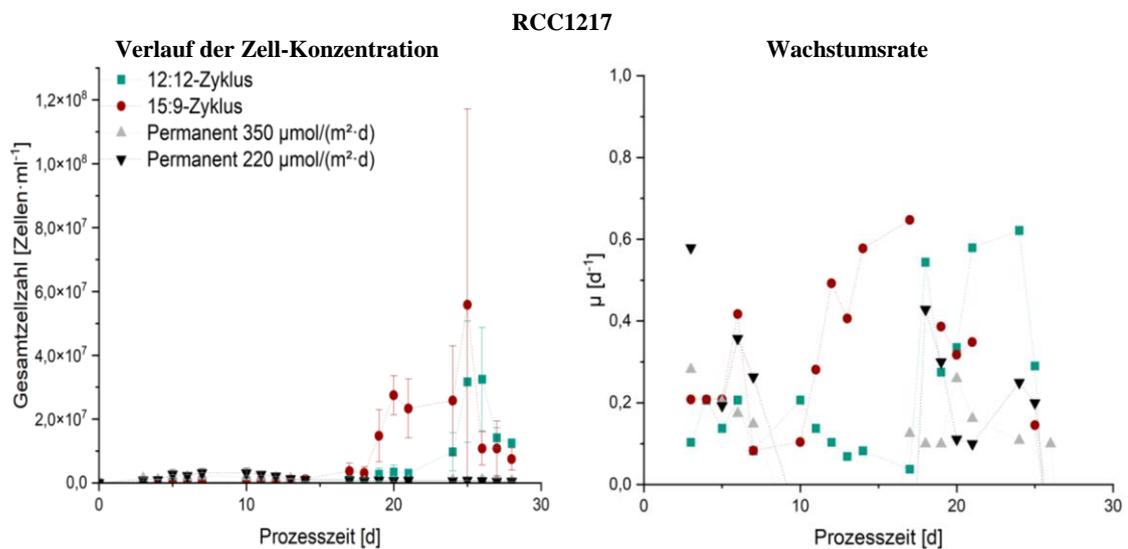


Abbildung 7.7: Links: Verlauf der Zellzahl während der Kultivierung unter vier verschiedenen Lichtbedingungen mit dem Stamm RCC1217. Rechts: Verlauf der Wachstumsrate  $\mu$

Der hoch-kalzifizierende Stamm CCMP3266 erreichte die höchste Zell-Konzentration bei einem 15:9-Hell-Dunkel-Zyklus. Wie bereits in Kapitel 4.1 ausgeführt, wird dieses Ergebnis auf eine vermutete zeitliche Trennung von Wachstum, Photosynthese und Kalzifizierung zurückgeführt. Die Kalzifizierung benötigt Lichtenergie und kann daher nur in der Hell-Phase stattfinden. Zudem kann die Zelle nicht gleichzeitig kalzifizieren und die Zellteilung durchführen. Ungeklärt ist jedoch, was diese zeitliche Trennung auslöst. So gibt es zwei Möglichkeiten: Zum einen kann eine „innere Uhr“ dazu führen, dass sich die Zelle bevorzugt in der Nacht teilt. Zum anderen könnte die Zelle „keine Wahl“ haben, da tagsüber die Kalzifizierung stattfinden muss und dabei die Zellteilung nur vermindert möglich ist. Aus diesem Grund sollte das Wachstumsverhalten des nicht-kalzifizierenden Stammes RCC1217 untersucht werden um diese Frage klären zu können. Da das Wachstum im Vergleich zu den kalzifizierenden Stämmen stark reduziert ist, wurden die Ergebnisse aus der Diskussion aus Kapitel 4.1 herausgezogen. Im Folgenden befindet sich eine kurze Interpretation der Ergebnisse.

Die höchste Zellkonzentration mit  $5,6 \cdot 10^7$  Zellen·ml<sup>-1</sup> wird bei der Verwendung eines 15:9-Zyklus verwendet. Dabei erreicht auch die gemittelte Wachstumsrate mit  $0,44 \text{ d}^{-1}$  den höchsten Wert.

Bei dem Stamm RCC1217 handelt es sich um eine haploide Form, die aus dem diploiden Stamm RCC1216 (entspricht Stamm CCMP3266) isoliert wurde [28]. Haploiden Zellen können nicht kalzifizieren [44]. Diese nackten Zellen (N-Zellen) bilden sich in Langzeit-Kultivierungen von *E. huxleyi* spontan [37]. So können sogar gesamte Populationen von einem kalzifizierenden (C-Zell) zu einem N-Zell-Morphotyp wechseln [24, 27, 36]. Bisher wurde jedoch nicht beobachtet, dass sie wieder in die kalzifizierende Form zurückkehren können [14, 23]. Der Übergang von kalzifizierenden Zellen (C-Zellen) zu N-Zellen wird durch stickstoff- und phosphorreiche Medien begünstigt [27, 36].

Stamm RCC1217 erreicht genau wie sein diploides Gegenstück Stamm CCMP3266 bei einer permanenten PFD von  $350 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  die geringste Zell-Konzentration. So könnte vermutet werden, dass dieser Stamm aufgrund der fehlenden Coccolithen keine Toleranz gegenüber hohe Photonenflussdichten besitzen könnte. Die Ergebnisse von Hariskos et al. zeigen jedoch, dass dieser Stamm problemlos hohe PFD tolerieren kann [16]. Da beide Stämme jedoch bei einem 15:9-Zyklus die maximale Zell-Konzentration erreichen, scheint auch das Wachstum des nicht-kalzifizierenden Stammes von der Verwendung von Hell-Dunkel-Zyklen zu profitieren. Untersuchungen haben gezeigt, dass sich die haploiden Zellen an Hell-Dunkel-Phasen synchronisieren können [9]. So befinden sich die Zellen während der Hellphase in der G<sub>1</sub>-Phase und wechseln eine Stunde nach Einbruch der Dunkelheit in die S-Phase [9]. Das Maximum der G<sub>2</sub>-Phase erreichen die Zellen dann 3-4 Stunden nach Einbruch der Dunkelheit und teilen sich dann mitotisch [9, 14]. Somit scheint die Frage, ob eine „innere Uhr“ oder die Kalzifizierung den Zeitpunkt der Zellteilung festlegt, beantwortet. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass beide Stämme genetisch identisch sind. So liegen die ESTs zwischen dem Stamm RCC1216 (entspricht CCMP3266) und RCC1217 bei 99,9 % [9]. So kann Stamm RCC1217 zwar keine Coccolithen produzieren, ob der Einfluss der Kalzifizierung auf das Wachstum jedoch komplett herunter reguliert wurde, kann nicht ausgeschlossen werden. N-Zellen besitzen trotzdem alle Komponenten, die zur Coccolithenproduktion benötigt werden, wie beispielsweise das Coccolithvesikel [36]. Diese Strukturen können allerdings in einem deformierten Zustand vorliegen [24]. Wie aber in dieser Arbeit gezeigt wurde, reagieren *E. huxleyi*-Stämme unterschiedlich auf Hell-Dunkel-Zyklen, was in der Literatur ebenfalls beobachtet wurde [8, 34, 35, 40, 49]. Dies festigt die Vermutung, dass das Wachstumsverhalten mit Hell-Dunkel-Zyklen von einer genetischen Komponente kontrolliert wird.

Im Vergleich zu Stamm CCMP3266 fällt auf, dass die erreichten Zell-Konzentrationen des Stammes RCC1217 deutlich geringer sind. So erreicht der kalzifizierende Stamm bei einem 15:9-Zyklus etwa drei Mal so hohe Zell-Konzentrationen. Auch die gemittelten Wachstumsraten sind um das 2,5-fache niedriger. In den Versuchen der Arbeitsgruppe von Mausz und Pohnert [28] konnten zwischen der haploiden und diploiden Form keine Unterschiede in den Wachstumsraten beobachtet werden. Diese Beobachtung unterstützen auch andere Ergebnisse [9]. Jedoch finden sich auch gegenteilige Beobachtungen. Diese zeigen, dass die Wachstumsrate von N-Zellen im Vergleich zu C-Zellen um etwa 15% geringer ausfiel [37]. In dieser Arbeit liegt die Abweichung jedoch bei etwa 42 %. Es ist jedoch zu beachten, dass Stamm RCC1217 im Gegensatz zu Stamm CCMP3266 nicht axenisch war, wodurch eine Beeinflussung der Wachstumsraten durch Fremdorganismen nicht ausgeschlossen werden kann.

## Schüttelkolbenversuche – Nährstoffverbrauch

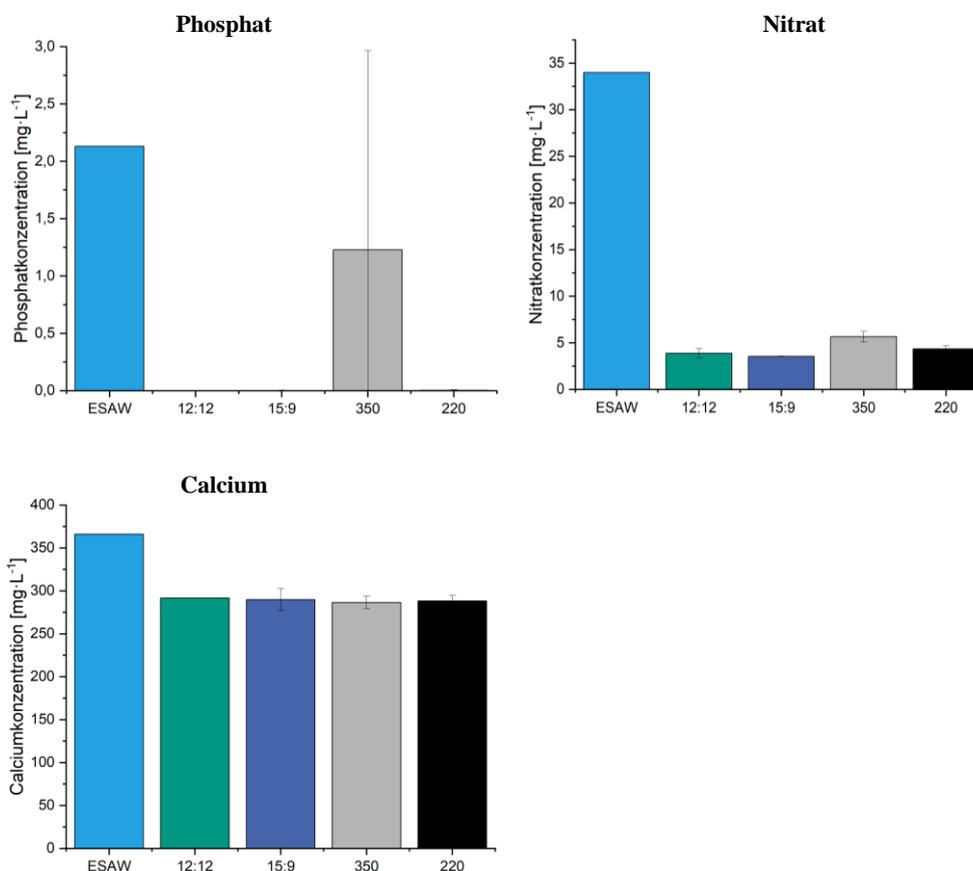


Abbildung 7.8: Startkonzentration im ESAW-Medium (Balken links) und Endkonzentrationen an Phosphat, Nitrat und Calcium während der Kultivierung des Stammes RCC1217 bei verschiedenen Lichtbedingungen

Tabelle 7.7: Zusammenfassung des Nährstoffverbrauches des nicht-kalzifizierenden Stammes

<b>RCC1217</b>				
	<b>12:12</b>	<b>15:9</b>	<b>350</b>	<b>220</b>
Phosphatverbrauch [mg·L <sup>-1</sup> ]	2,1	2,1	0,9	2,1
Nitratverbrauch [mg·L <sup>-1</sup> ]	30,1	30,5	28,3	29,7
Calciumverbrauch [mg·L <sup>-1</sup> ]	74,4	76,2	79,6	77,9

Wird der Phosphatgehalt pro Zelle betrachtet, so fällt auf, dass dieser mit Werten zwischen 0,04-0,67 pg·Zelle<sup>-1</sup> im Vergleich zu den kalzifizierenden Stämmen, relativ hoch ist. Hierfür sind zwei Erklärungsansätze naheliegend. Zum einen wird für die Herstellung der Coccolithen Phosphor benötigt [20]. Da der Stamm jedoch nicht kalzifizieren kann, aber alle Komponenten zur Coccolithenbildung besitzt, könnte sich der Phosphor in der Zelle angesammelt haben. Zum anderen könnten die Fremdorganismen durch Phosphataufnahme den Messwert verfälscht haben [36]. Wenn

es dadurch in den Kulturen zu einer Phosphatlimitierung kam, könnten somit die niedrigen Zell-Konzentrationen erklärt werden, die der Stamm RCC1217 erreicht hat.

Die Kultur mit der höchsten Zell-Konzentration zeigt auch den höchsten Nitratverbrauch. Dieser Verbrauch nimmt in absteigender Reihenfolge auf die Zellzahl bezogen ab und passt sich somit vollständig an das Wachstum der Kulturen an. Werden die erreichten Zell-Konzentrationen mit einbezogen, so wirkt der Verbrauch an Nitrat sehr hoch, da die kalzifizierenden Stämme Konzentrationen in ähnlichen Mengen verbraucht haben. Wird davon ausgegangen, dass *E. huxleyi* ein Zellgewicht von 20 pg besitzt und davon wiederum 50 % durch Kohlenstoff eingenommen werden, sind die Nitratgehalte von 0,55-12,60 pg·Zelle<sup>-1</sup> unrealistisch hoch. Daher wird auch hier angenommen, dass Fremdorganismen den Nitratverbrauch erhöht haben.

Obwohl Stamm RCC1217 keine Coccolithen bilden kann, wird je nach Versuchsparameter ein Calciumverbrauch von 74-80 mg·L<sup>-1</sup> beobachtet. Wird von einem Calciumgehalt von 0,92 % an der Biomasse ausgegangen, so würden für die erreichten Zellzahlen Calciumkonzentrationen im Bereich von 0,1-0,2 mg·L<sup>-1</sup> benötigt werden [39]. Das zeigt, dass die Zellen viel mehr Calcium aufnehmen, als sie benötigen würden. Dies unterstreichen auch die Calciumgehalte in den Zellen die im Bereich von 1,36-35,36 pg·Zelle<sup>-1</sup> liegen. Stamm RCC1217 besitzt alle nötigen Komponenten für die Kalzifizierung [36]. Somit könnten die Zellen Calcium aufgenommen und in den dafür vorgesehenen Vesikeln angesammelt haben. Die Arbeitsgruppe von Müller et al. konnte beobachten, dass nicht-kalzifizierende Zellen bei hohen Calciumkonzentrationen ein verschlechtertes Wachstum zeigten, während das Wachstum von kalzifizierenden Zellen nicht negativ beeinflusst wurde [30]. Die Autoren vermuteten, dass die Zellen aufgrund der fehlenden Fähigkeit Coccolithen zu bilden, keine Möglichkeit besaßen einer zellulären Calciumvergiftung entgegen zu wirken [30].

## Übertragen auf einen Rührkesselreaktor

### Molekulare Betrachtung des Wachstums unter Hell-Dunkel-Zyklen

Um der anstehenden Diskussion besser folgen zu können, werden einige molekularbiologische Begriffe im nachfolgenden erklärt.

- **Cyclin A:** Cyclin A ist in der S-Phase und bei dem Übergang von der G<sub>2</sub>-Phase in die M-Phase involviert [4]. Es wird zu Beginn der S-Phase synthetisiert und stimuliert die DNS-Synthese [2, 33]. In der Mitose unterstützt es die Chromosomenkondensation und den Abbau der Kernhülle [33].
- **Cyclin B:** Cyclin B steuert die Mitose. Durch Komplexbildung und Phosphorylierung bestimmter Proteine wird die Mitose gestartet. Zudem ist ein Abbau von Cyclin B notwendig, damit die Zelle die Mitose beenden kann [38].
- **Cyclin D:** In der frühen G<sub>1</sub>-Phase führt Cyclin D zu der Phosphorylierung der Retinoblastom-Proteine (Rb), wodurch es an dem Übergang von der G<sub>1</sub>- zur S-Phase beteiligt ist [33, 41].
- **CDKA:** Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) sind regulatorische Proteine, die an ganz bestimmten Punkten des Zellzyklus aktiviert werden [33]. CDKA ist ortholog zu CDK1 [2]. CDKA wird zum Ende der G<sub>1</sub>-Phase aktiv und phosphoryliert anschließend mehrere Komplexe an den Replikationsursprüngen, wodurch die DNS-Replikation initiiert wird [12].
- **CDKB:** Wird zusammen mit CDKA für die Regulation der G<sub>2</sub>/M-Aktivität benötigt [21].
- **Rb:** Im nicht phosphorylierten Zustand unterdrücken Rb-Proteine die Zellproliferation, da sie den Transkriptionsfaktor E2F binden und somit gehemmt werden [26, 47]. Durch die Phosphorylierung in der späten G<sub>1</sub>-Phase wird E2F freigesetzt und initiiert die Gene die für das Fortschreiten des Zellzyklus notwendig sind [33, 47]. Für die Phosphorylierung werden mindestens drei verschiedene CDKs benötigt [47].

Die Zellen führen ihre Teilung bevorzugt in der Dunkelphase durch. Allerdings ist unklar, welcher Mechanismus die Teilung in der Hellphase unterdrückt. In tierischen Zellen kann p53 als Transkriptionsfaktor fungieren und aktiviert beispielsweise das Gen für das p21-Protein [25]. Das Protein p21 kann verschiedene cyclinabhängige Proteinkinasen inhibieren und somit den Zellzyklus in der G<sub>1</sub>-Phase anhalten [25]. Obwohl die Zahl an Algengenomsequenzierungsprogrammen zunimmt, wurde bisher kein p53-Homolog gefunden [32]. Eine weitere Möglichkeit der Beeinflussung des Zellzyklus könnten Mitosehemmer sein. Bei der Verwendung niedriger Konzentrationen der Hemmer Amiprophos Methyl, Griseofulvin und Oryzalin wurde die Mitose bei *Monostroma angicava* gestoppt, da sie vermutlich die Mikrotubuli in den Gametophytenzellen depolymerisieren [19]. Andere Inhibitoren, wie Colchicin und 8-Hydroxychinolin zeigten hingegen keinen Effekt [19]. So könnte eine Möglichkeit darin bestehen, dass *E. huxleyi* und andere Algenarten, die sensitiv auf Hell-Dunkel-Zyklen reagieren, eigene Mitosehemmer synthetisieren können, wodurch sie über die Möglichkeit zur Kontrolle der Zellteilung verfügen.

Wie bereits vermutet wurde, könnte die Zellteilung jedoch auch von einer spezifischen „inneren Uhr“ kontrolliert werden. So wurde herausgefunden, dass die Lichtintensität einen Einfluss auf die Länge der G<sub>1</sub>-Phase besitzt [29]. Bei niedrigen Intensitäten wurde die Dauer der G<sub>1</sub>-Phase verlängert und bei hohen Intensitäten wurde ein gegenteiliger Effekt beobachtet [29]. Dies ist soweit sinnvoll, da die Zelle während der G<sub>1</sub>-Phase die Bausteine der Nukleinsynthese herstellt und dieser Prozess bei zu geringer Lichtenergie verlängert werden kann. Die Lichtintensität beeinflusst den Beginn der S-Phase jedoch nicht. So kultivierten Moulager et al. [29] die Alge *Ostreococcus tauri* unter einem 12:12-Hell-Dunkel-Zyklus. Zu dem Zeitpunkt, in dem das Licht eingeschaltet wurde, befanden sich die Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase. Anschließend wurde die Lichtintensität und die Dauer der Hell-Phase variiert [29]. Doch unabhängig von den gewählten Parametern, trat ein Großteil der Zellen nach 6 Stunden in die S-Phase ein [29]. Dies ließ die Autoren vermuten, dass der Eintritt in die S-Phase zeitlich gesteuert wird [29]. Um diese Vermutung zu festigen, untersuchten Moulager et al. anschließend die Transkriptionsmuster einiger Gene, die für das Fortschreiten der G<sub>1</sub>-Phase notwendig sind [29]. Dabei beobachteten sie, dass die mRNA-Level der Zellzyklusgene Cyclin A, Cyclin D, CDKA, CDKB und Rb bei niedrigen und hohen Lichtintensitäten ähnlich waren, was die Vermutung einer zeitlichen Regulation unterstützt [29]. Die Level all dieser Gene stiegen im Verlauf der G<sub>1</sub>-Phase an und erreichten in der S-Phase ihr Maximum. Eine ähnliche Beobachtung konnte auch die Arbeitsgruppe von Zachleder et al. machen. Sie untersuchten die CDK-Aktivitäten von *Desmodesmus quadricauda* bei unterschiedlichen Tageslängen [50]. Dabei wurde beobachtet, dass die CDK-Aktivität nach einer 15-stündigen Lichtphase nach Eintritt in die Dunkelphase anstieg [50]. Interessanterweise stieg die Aktivität ebenfalls nach 15 Stunden an, auch wenn die Hellphase auf 22, 27 und 39 Stunden erhöht wurden [50]. Leider ist nicht bekannt, in welcher Zellzyklusphase sich die Zellen befanden. Aber auch bei *Desmodesmus quadricauda* scheint ein zeitlicher Aspekt die Regulierung der Enzyme zu steuern. Die Arbeitsgruppe fand zudem heraus, dass die CDK-Aktivitäten geringer sind, wenn die Hellphase länger als 15 Stunden andauert [50]. Da CDKA durch Phosphorylierung die DNS-Replikation initiiert, könnte eine geringere Aktivität den Prozess der Zellproliferation verlangsamen, wodurch die geringere Zell-Konzentration bei der Kultivierung mit permanenten Licht erklärt werden könnte. Doch eine reine zeitliche Regulierung scheint nicht vorzuliegen. So steigt das cAMP-Level nach Einschalten des Lichtes an, sinkt jedoch auf den Ausgangswert, bevor die Zellen in die S-Phase übergangen [29]. Wird die Kultur mit einer niedrigen Lichtintensität kultiviert, so bleibt der cAMP-Spiegel gering, was dafür spricht, dass die cAMP-Synthese ein lichtabhängiger Prozess ist. Um die Auswirkungen des cAMP-Levels auf den Zellzyklus zu untersuchen, hemmten Moulager et al. in ihren Versuchen die cAMP-Synthese. Dabei zeigte sich, dass es keinen Übergang der Zellen in die S-Phase gab und auch die Cyclin A-Menge äußerst gering war [29]. Somit ist cAMP für den Eintritt in die S-Phase sowie für die Cyclin A-Synthese erforderlich [29]. Das entstehende Cyclin A-Protein kann dann an CDKA und Rb binden, wodurch es zur Freisetzung des E2F-Transkriptionsfaktors nach Phosphorylierung von Rb führt [29]. Es ist vorstellbar, dass Cyclin A/CDKA der hemmenden Wirkung von Rb entgegenwirken kann [29]. Anschließend verhindert ein anderer Zeitmechanismus den Eintritt in die S-Phase vor 6 Stunden nach dem Einschalten des Lichtes [29]. Ob es sich dabei jedoch um eine zirkadiane Uhr handelt ist bisher unbekannt [29]

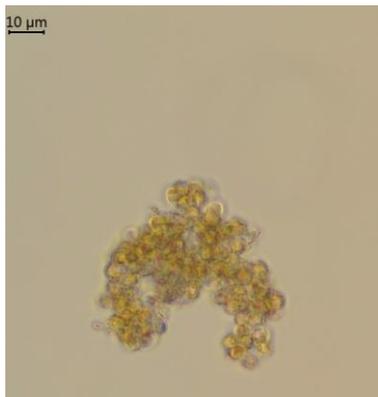


Abbildung 7.9: Aggregierte Zellen im Schüttelkolben

### 7.3.2 Einfluss niedriger Photonenflussdichten auf das Wachstum und die Kalzifizierung von *Emiliana huxleyi*

In den Versuchen von Hariskos et al. wurde durch Erhöhung der Photonenflussdichte (PFD) die Auswirkung auf die Wachstumsrate von *E. huxleyi* untersucht [16]. Jedoch wurden die Einflüsse der PFD auf die Kalzifizierung nicht berücksichtigt. Nachdem die Ergebnisse der Versuche mit Hell-Dunkel-Zyklen (siehe Kapitel 4.1) gezeigt haben, dass der Stamm CCMP3266 seine höchste Coccolithen-Konzentration bei einer Photonenflussdichte von  $220 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  erreicht hat, sollte in dieser Versuchsreihe der Einfluss der PFD auf die Kalzifizierung bei niedrigeren Lichtintensitäten untersucht werden. Daher wurden Versuchsreihen mit permanenten Licht bei einer PFD von  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  und  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  durchgeführt. Die Daten der Versuchsreihen, die mit einer PFD von 350 und  $220 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  behandelt wurden, sind aus den Versuchen mit dem Stamm CCMP3266 aus Kapitel 4.1.1 übernommen.

Die folgende Tabelle 7.8 stellt eine Zusammenfassung der Ergebnisse dar.

Tabelle 7.8: Zusammenfassung der Ergebnisse während der Kultivierung mit unterschiedlichen PFDs

	<b>60</b> $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	<b>100</b> $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	<b>220</b> $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	<b>350</b> $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
<b>Maximale Zellzahl</b> [Zellen·ml <sup>-1</sup> ]	$7,5\cdot 10^7$	$8,2\cdot 10^7$	$1,4\cdot 10^8$	$1,2\cdot 10^8$
<b>Gemittelte Wachstumsrate</b> [d <sup>-1</sup> ]	0,68	0,72	0,76	0,77
<b>Maximale Coccolithen-Konzentration</b> [Coccolithen·ml <sup>-1</sup> ]	$5,1\cdot 10^7$	$6,8\cdot 10^7$	<b><math>6,1\cdot 10^8</math></b>	$3,5\cdot 10^8$
<b>Gemittelte zelluläre Coccolithen-Produktivität</b> [Coccolithen·Zelle <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> ]	0,7	1,5	<b>3,2</b>	5,1
<b>Γ<sub>Photonen, abs</sub></b> [μmol Photonen·Zelle <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> ]	$2,4\cdot 10^{-6}$	$3,6\cdot 10^{-6}$	$4,7\cdot 10^{-6}$	$8,7\cdot 10^{-6}$

Als eine Theorie der möglichen Auslöser für die Algenblüten von *E. huxleyi* gelten hohe Lichtintensitäten. So konnte von Mai bis Juni 1955 in einem Fjord in Norwegen mit  $115 \cdot 10^6$  Zellen·L<sup>-1</sup> die höchsten Zell-Konzentrationen, die jemals während einer Algenblüte erreicht wurden, gemessen werden [5]. Aufgrund der Jahreszeit wurde schnell geschlussfolgert, dass die hohen Lichtintensitäten dieses Phänomen ausgelöst haben. Diese Vermutung wurde durch die Mesokosmos-Versuche von Egge und Heimdal unterstützt. Dabei wurden Proben aus einem Fjord in der Nähe von Bergen entnommen und verschiedenen Nährstoff- und Lichtbedingungen ausgesetzt. Ihre Ergebnisse zeigten, dass die *E. huxleyi*-Blüte oft nach hohen Oberflächenbestrahlungsintensitäten auftraten [11]. Ein weiteres stützendes Argument lautet, dass die Blüten stets in stark geschichtetem Gewässer mit einer Mischtiefe von etwa 10-20 m auftreten, wodurch die durchschnittlichen Lichtintensitäten an der Oberfläche sehr hoch sind [31]. Generell gilt *E. huxleyi* als lichttoleranter Organismus, weshalb solche Bedingungen einen Vorteil gegenüber anderem Phytoplankton schaffen [48]. Eine fehlende Photohemmung bei den höchsten Lichtintensitäten, die in der Natur auftreten, wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen im Labor bestätigt [3, 31]. Dies ist Möglich, da das Genom von *E. huxleyi* eine große Anzahl an Photorezeptoren und Proteinen die beim Aufbau und bei der Reparatur des Photosystem II involviert codiert [43]. Darüber hinaus werden Gene, die Antioxidanten mit Bindung an reaktive Sauerstoffspezies (ROS) codiert. Dies erhöht die Toleranz gegenüber hohen Lichtintensitäten, da so oxidative Schäden verhindert werden können [43]. Es steht jedoch fest, dass sich höhere Photonendichte positiv auf das Wachstum von *E. huxleyi* auswirken [45]. So nimmt die Wachstumsrate mit steigender PFD zu sowie die Zellzahl und Coccolithenzahl pro Zelle [13, 18]. Dies zeigen auch die ausführlichen Versuche von Hariskos et al. [16]. Dort stiegen die Wachstumsraten für den hier verwendeten Stamm bis zu einer PFD von  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  und bleiben bis zu einem Wert von  $500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  nahezu konstant [16]. Dabei handelt es sich vermutlich um den lichtgesättigten Bereich. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Annahme. So steigt die gemittelte Wachstumsrate von  $0,68 \text{ d}^{-1}$  bei einer PFD von  $60 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  auf einen Wert von  $0,77 \text{ d}^{-1}$  bei  $350 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  an und auch die gemittelten Raten im Bereich von  $100$ - $350 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  sind fast konstant. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte ein Einfluss der Lichtintensität auf der Länge der G<sub>1</sub>-Phase im Zellzyklus sein [29]. So wurde die Alge *Ostreococcus tauri* von der Arbeitsgruppe von Moulager et al. in einem 12:12-Tag-Nacht-Zyklus kultiviert und dabei verschiedenen Lichtintensitäten ausgesetzt [29]. Sie konnten beobachten, dass bei niedrigen Intensitäten ( $8$  und  $35 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) die Dauer der G<sub>1</sub>-Phase von  $6$  auf  $9$  Stunden verlängert wurde [29]. Auch ein umgekehrter Effekt zeigte sich [29]. So betrug die G<sub>1</sub>-Phase bei hohen Lichtintensitäten ( $100$  und  $150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) lediglich  $3$  bis  $4$  Stunden [29]. Bezogen auf die Ergebnisse dieser Arbeit, lässt sich dadurch ableiten, dass bei einer PFD von  $60 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  die G<sub>1</sub>-Phase verlängert wurde, was in dem Versuchszeitraum zu weniger Zellteilung führte und somit das Wachstum der Kultur verlangsamte, während der gegenteilige Effekt bei den Kulturen mit höhere PFD eintrat. Da die gemittelten Wachstumsraten bei den PFDs zwischen  $100$  und  $350 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  jedoch etwa konstant sind, lässt sich ein anderer Effekt beobachten: Wird die PFD auf die Wachstumsraten bezogen, so zeigt sich, dass die Kultur mit einer PFD von  $220 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  im Vergleich zu der Kultur mit einer PFD von  $350 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  eine verbesserte Lichtnutzungseffizienz von  $37 \%$  besitzt und die Kultur mit  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  sogar einen Wert von  $71 \%$  erreicht. Werden die Kulturen mit einer PFD von  $60$  und  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  zeigt sich, dass obwohl die eine Kultur  $40 \%$  weniger Licht erhalten, die erreichte Wachstumsrate nur um  $5.6 \%$  verringert ist. Dies ändert jedoch nichts an der Tatsache, dass die

maximale Zell-Konzentrationen bei einer Kultivierung mit 60 und 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  nur etwa halb so hoch sind wie bei den Kulturen mit höheren PFDs.

In den ersten 6 Tagen zeigt keine Versuchsreihe eine merkliche Veränderung in der Konzentration an Coccolithen. Die höchste Coccolithen-Konzentration wird mit einer Lichtintensität von 220  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  an Tag 12 erreicht. Nach Erreichen des Maximums sinken die Konzentrationen in allen Ansätzen bereits einen Tag später wieder ab. Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass bei der Verwendung von hohen PFD in dieser Arbeit die höchsten Coccolithen-Konzentrationen erreicht werden. Es ist jedoch sicher, dass Coccolithen nicht als Sonnenschutzmittel für die Zelle dienen. Dies zeigt sich, da nicht-kalzifizierende Stämme Licht in gleicher oder sogar höherer Intensität tolerieren können [16, 31, 37, 48]. Jedoch konnte die Arbeitsgruppe von Feng et al. beobachten, dass die Kalzifizierungsrate von *E. huxleyi* von der Lichtintensität abhängt und auch andere Autoren konnten ähnliche Erkenntnisse gewinnen [13, 18]. Feng et al. erhöhten in ihren Versuchen die PFD von 14 auf 650  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Dabei konnten sie beobachten, wie die Kalzifizierungsrate von *E. huxleyi* mit steigender PFD zunahm, bis sie bei 190  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  einen maximalen Wert erreichte [13]. Ab einem Wert von 350  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  sank die Kalzifizierungsrate [13]. Wenn die Kalzifizierungsrate bei dem in dieser Arbeit verwendeten Stamm ebenfalls bei einer PFD von 220  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  am höchsten ist, könnte dies erklären, warum die Coccolithen-Konzentration höher ist, als bei einer PFD von 350  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Da die den Kulturen mit einer PFD von 60 und 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  deutlich niedrigere Coccolithen-Konzentrationen erreicht wurden, lässt sich vermuten, dass die gewählten Lichtintensitäten zu gering waren, als dass sie das Wachstum der Kultur und die Kalzifizierung energetisch versorgen könnten. Wie oben bereits erwähnt wurde, scheint die Lichtnutzungseffizienz bezogen auf das Wachstum bei niedrigen Photonenflussdichten besser zu sein. Jedoch wird bei hohen PFD das überschüssige Licht nicht verschwendet, sondern zum Teil von der Alge für die Produktion von beispielsweise Stärkespeichern verwendet [15]. Bei Coccolithophoren kann die überschüssige Energie zudem für die Bildung der Coccolithen verwendet werden, da die Kalzifizierung als energieabhängiger Prozess von der Photosynthese abhängig ist. Der Energieaufwand für ein Mol  $\text{CaCO}_3$  liegt bereits bei 4,6 Mol Photonen [1, 36, 42]. Wenn davon ausgegangen wird, dass die Gesamtkosten für photosynthetischen Wachstum bei 24 Mol Photonen pro Mol  $\text{CO}_2$  liegt, entspricht der Energieaufwand für die Bildung von  $\text{CaCO}_3$  etwa 19 % der benötigten Energie für das Wachstum, was einen enormen Energiebedarf darstellt [42].

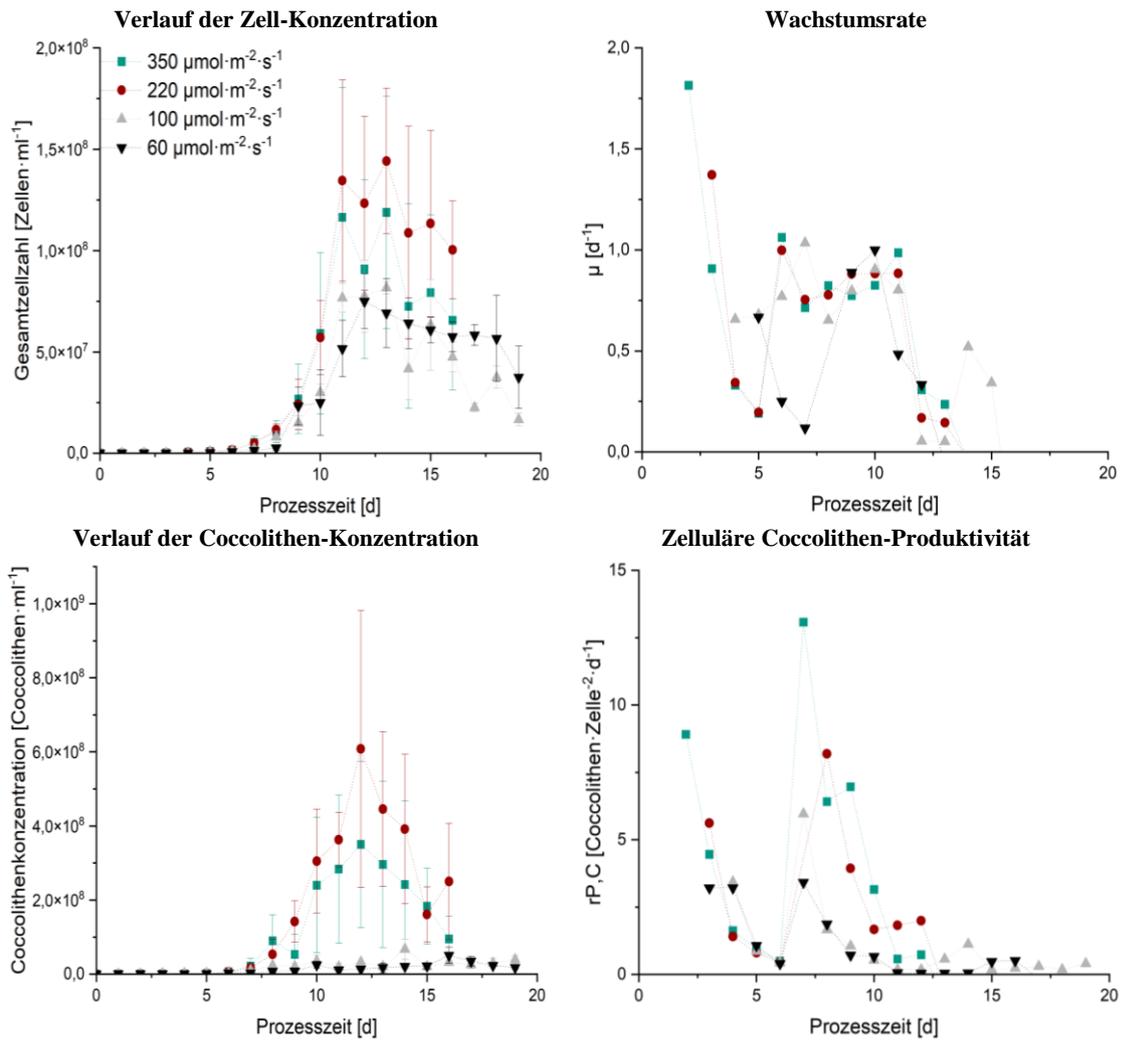


Abbildung 7.10: Links: Verlauf der Zellzahl (oben) und Coccolithen-Konzentration (unten) während der Kultivierung

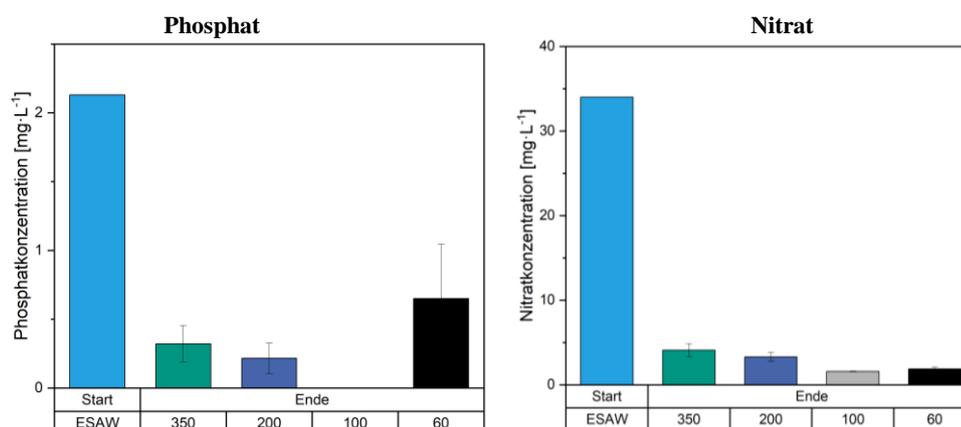


Abbildung 7.11: Endkonzentrationen an Phosphat und Nitrat der Versuchsreihen mit unterschiedlichen Photonenflussdichten

Tabelle 7.9: Zusammenfassung des Nährstoffverbrauches bei Veränderung der PFD

	60 μmol·m <sup>-2</sup> ·s <sup>-1</sup>	100 μmol·m <sup>-2</sup> ·s <sup>-1</sup>	220 μmol·m <sup>-2</sup> ·s <sup>-1</sup>	350 μmol·m <sup>-2</sup> ·s <sup>-1</sup>
Phosphatverbrauch [mg·L <sup>-1</sup> ]	1,5	2,1	1,9	1,8
Nitratverbrauch [mg·L <sup>-1</sup> ]	32,1	34,4	30,7	30,0
Calciumverbrauch [mg·L <sup>-1</sup> ]	-	-	83,5	58,9

### 7.3.3 Optimierung des ESAW-Mediums

#### Berechnung der elementaren Zusammensetzung

Für die Berechnung der elementaren Zusammensetzung wurde von folgender makromolekularen Zusammensetzung ausgegangen:

Proteine:	38 %	Pigmente:	3 %
Kohlenhydrate:	20 %	RNS:	8 %
Lipide:	15 %	DNS:	1 %

Für den elementaren Anteil an den Proteinen und auch allen anderen makromolekularen Komponenten, wurde von einer theoretischen Biomassekonzentration von 100 g ausgegangen. So konnte mit Hilfe der Tabelle 4.7 der Anteil an Stickstoff und Schwefel berechnet werden:

Tabelle 7.10: Berechnung des N- und S-Anteils an den Proteinen

AS	Mittelwert Anteil [%]	AS an Proteingehalt [g]	MW AS [ $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ]	wN,AS	wS,AS	N an AS [g]	S an AS [g]
Asp	9.9	3.8	133.1	0.1	0.0	0.40	0.00
Thr	5.1	1.9	119.1	0.1	0.0	0.23	0.00
Ser	5.5	2.1	105.1	0.1	0.0	0.28	0.00
Glu	10.5	4.0	147.1	0.1	0.0	0.38	0.00
Gly	6.6	2.5	75.1	0.2	0.0	0.47	0.00
Ala	8.7	3.3	89.1	0.2	0.0	0.52	0.00
Cys	1.0	0.4	121.2	0.1	0.3	0.04	0.10
Val	5.6	2.1	117.1	0.1	0.0	0.26	0.00
Met	1.4	0.5	149.2	0.1	0.2	0.05	0.11
Ile	3.0	1.1	131.2	0.1	0.0	0.12	0.00
Leu	8.7	3.3	131.2	0.1	0.0	0.35	0.00
Tyr	5.1	1.9	181.2	0.1	0.0	0.15	0.00
Phe	5.5	2.1	165.2	0.1	0.0	0.18	0.00
His	1.8	0.7	155.2	0.3	0.0	0.19	0.00
Lys	6.4	2.4	146.2	0.2	0.0	0.46	0.00
Arg	6.6	2.5	174.2	0.3	0.0	0.81	0.00
Trp	1.9	0.7	204.2	0.1	0.0	0.10	0.00
Orn	0.1	0.0	132.2	0.2	0.0	0.01	0.00
Pro	4.3	1.6	115.1	0.1	0.0	0.20	0.00

AS: Aminosäure, MW: Molekulargewicht, w: Massenanteil

Für den Anteil an Stickstoff und Magnesium an den Pigmenten, wurde davon ausgegangen, dass Chlorophyll a (Chl a) das einzige vorhandene Pigment ist.

Tabelle 7.11: Berechnung des N- und Mg-Anteils an den Pigmenten

Chl a an Biomasse [g]	MW Chl a [ $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ]	wN,Chl a	wMg,Chl a	N an Pigment [g]	Mg an Pigment [g]
3	893.5	0.1	0.001	0.2	0.003

MW: Molekulargewicht, w: Massenanteil

Für die Bestimmung der elementaren Anteile der RNS wurde davon ausgegangen, dass die Nucleotide alle gleichmäßig auf den RNS-Gehalt an der Biomasse aufgeteilt sind.

Tabelle 7.12: Zusammensetzung der Nucleotide der RNS

Strukturformel Nucleotide	MW [ $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ]	wN,CGAU	wP,CGAU
C	PO <sub>4</sub> -C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> -C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> N <sub>3</sub> O	0.1	0.1
G	PO <sub>4</sub> -C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> -C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>5</sub> O	0.2	0.1
A	PO <sub>4</sub> -C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> -C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>5</sub>	0.2	0.1
U	PO <sub>4</sub> -C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> -C <sub>4</sub> H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.1	0.1

MW: Molekulargewicht, w: Massenanteil

Tabelle 7.13: Berechnung des N- und P-Anteils an der RNS

<b>RNS an Biomasse [g]</b>	<b>N an RNS [g]</b>	<b>P an RNS [g]</b>
8	1,3	0,8

Für die Berechnung des Stickstoff- und Phosphor-Gehaltes an der DNS wurde mit einem GC-Gehalt von 67 % und einem AT-Gehalt von 33 % gerechnet [7].

Tabelle 7.14: Zusammensetzung der Nucleotide der DNS

	<b>Strukturformel Nucleotide</b>	<b>MW [g·mol<sup>-1</sup>]</b>	<b>wN,GC,AT</b>	<b>wP,GC,AT</b>
GC	PO <sub>4</sub> -C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> O-C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> N <sub>3</sub> O-C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>5</sub> O-C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> O-PO <sub>4</sub>	679	0.17	0.09
AT	PO <sub>4</sub> -C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> O-C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub> -C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> O-PO <sub>4</sub>	680	0.14	0.09

Tabelle 7.15: Berechnung des N- und P-Anteils an der DNS

<b>DNS an Biomasse [g]</b>	<b>N an DNS [g]</b>	<b>P an DNS [g]</b>
0,8	0.13	0,07

## Optimierungsversuch

### 1. Modifikationsansatz

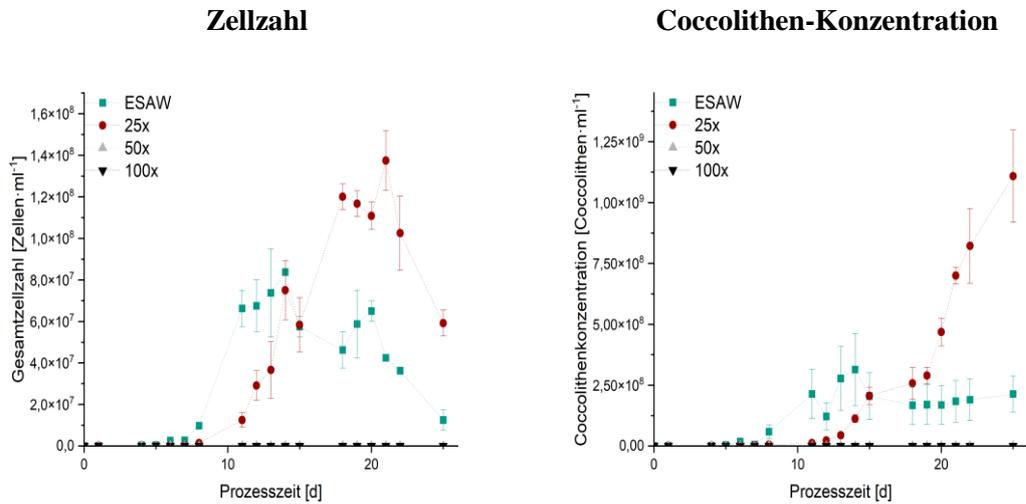


Abbildung 7.12: 1. Modifikationsansatz: Erhöhung der Konzentrationen an Phosphat, Nitrat, den Spurenelementen und den Vitaminen um das 25x, 50x und 100x. Im Vergleich dazu sind die Kurvenverläufe des ESAW-Mediums dargestellt

### 2. Modifikationsansatz

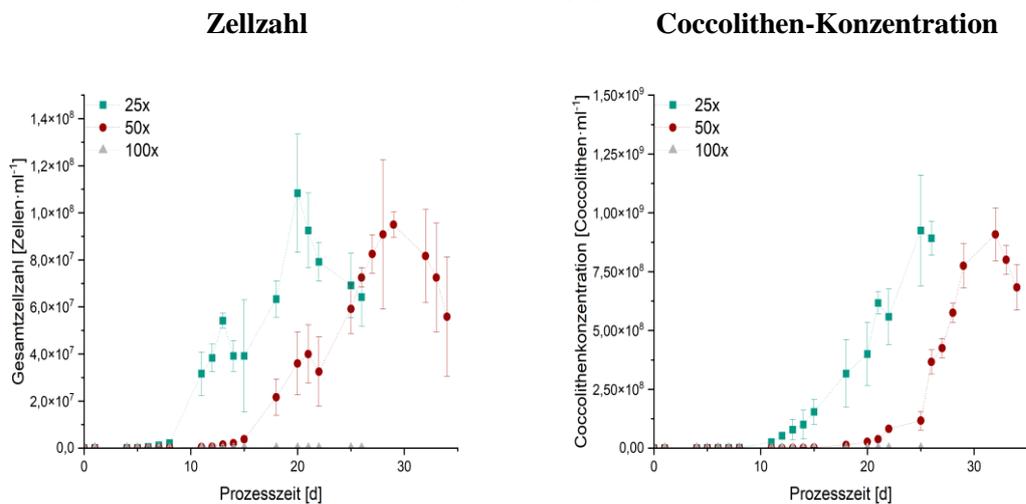
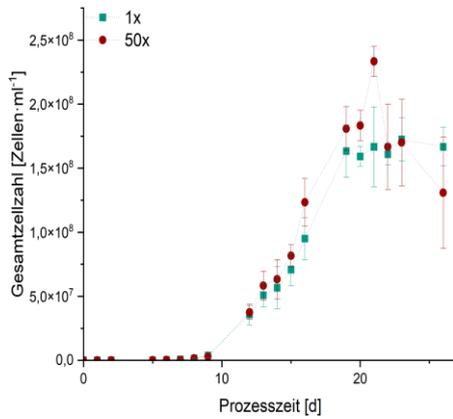


Abbildung 7.13: 2. Modifikationsansatz: Erhöhung der Konzentrationen an Phosphat, Nitrat und den Vitaminen um das 25x, 50x und 100x. Die Konzentration der Spurenelemente betrug das 0,25-fache

### 3. Modifikationsansatz

#### Zellzahl



#### Coccolithen-Konzentration

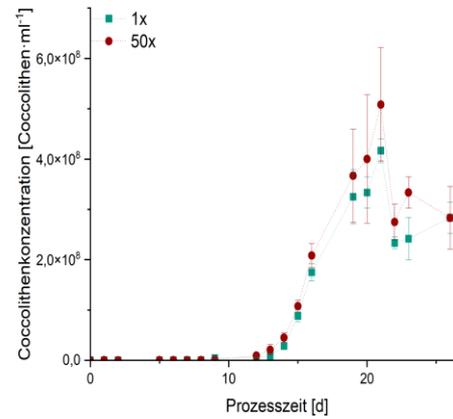
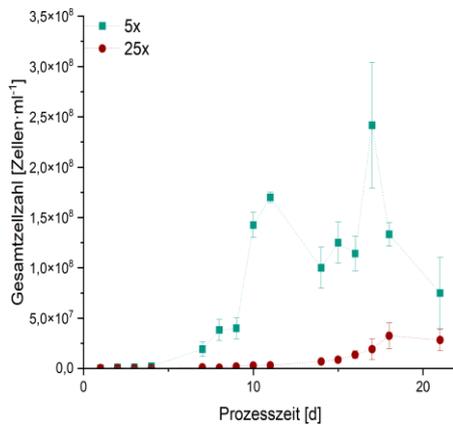


Abbildung 7.14: 3. Modifikationsansatz: Erhöhung der Konzentrationen an Phosphat, Nitrat und den Spurenelementen um das 25x, 50x und 100x. Die Konzentration der Vitamine lag bei der 1x und 50x

### 4. Modifikationsansatz

#### Zellzahl



#### Coccolithen-Konzentration

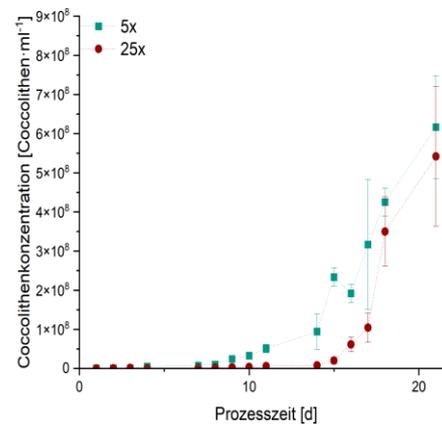


Abbildung 7.15: 4. Modifikationsansatz: Erhöhung der Konzentrationen an Phosphat, Nitrat und den Spurenelementen um das 25x, Erhöhung der Vitaminkonzentration um das 50x und Variation der Eisenkonzentration um das 5- und 25-fache

## 5. Modifikationsansatz

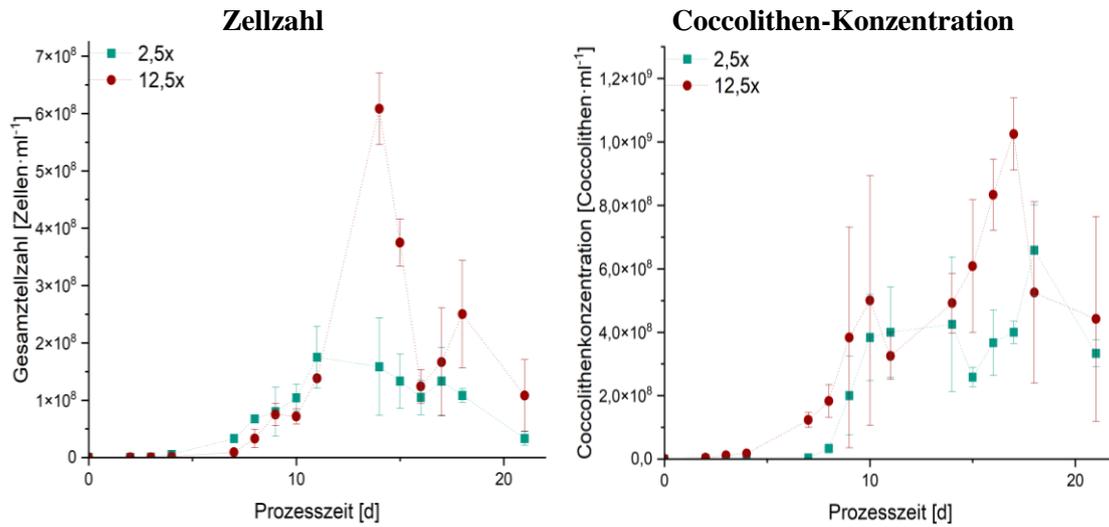


Abbildung 7.16: 5. Modifikationsansatz: Erhöhung der Konzentrationen an Phosphat, Nitrat und den Spurenelementen um das 25x, Erhöhung der Vitaminkonzentration um das 50x und Variation der Siliziumkonzentration um das 2,5- und 12,5-fache

## 6. Modifikationsansatz

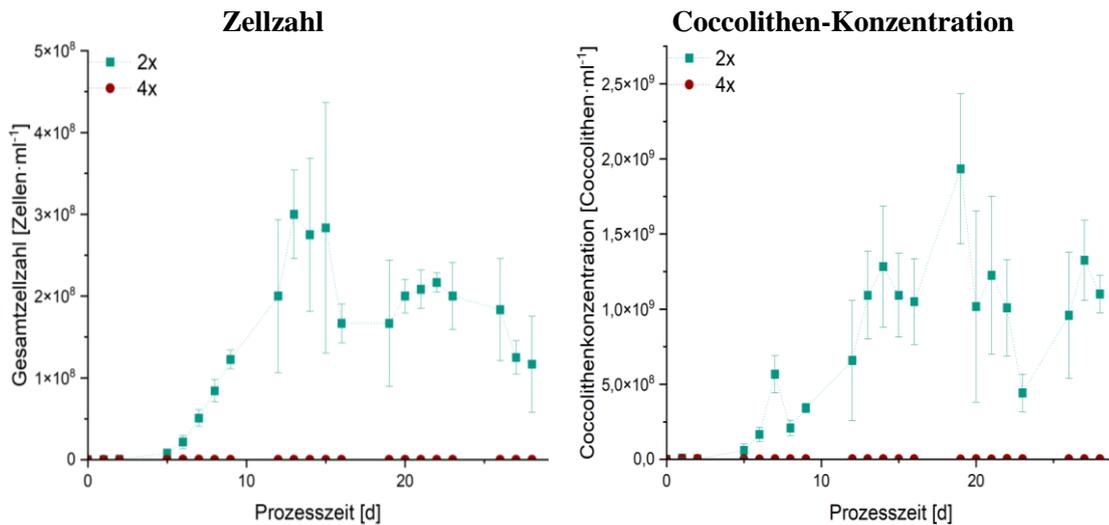


Abbildung 7.17: 6. Modifikationsansatz: Verdopplung und Vervielfachung der Salzlösung I und II. Zudem Erhöhung der Konzentrationen an Phosphat, Nitrat und den Spurenelementen um das 25x, Erhöhung der Vitaminkonzentration um das 50x und Erhöhung der Siliziumkonzentration um das 12,5-fache

## Verbrauch an Phosphat, Nitrat und Calcium

Tabelle 7.16: Differenz der Start- und Endkonzentrationen an Phosphat, Nitrat und Calcium. Angaben in mg·L<sup>-1</sup>

Ansatz	Veränderung	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Ca <sup>2+</sup>
0	ESAW	1,8	34,1	41,4
1	25x	13,8	100,6	254,8
	50x	6,7	-39,5	271,3
	100x	-4,1	-80,3	193,6
2	25x	19,3	274,8	-
	50x	39,7	243,2	-
	100x	49,5	353,6	-
3	1x	28,7	152,5	292,3
	50x	33,6	297,3	285,9
4	5x	26,2	113,3	245,3
	25x	32,4	279,5	253,5
5	2,5x	41,3	208,9	245,3
	12,5x	34,1	178,6	277,4
6	2x	36,0	110,0	-
	4x	33,8	-89,3	-

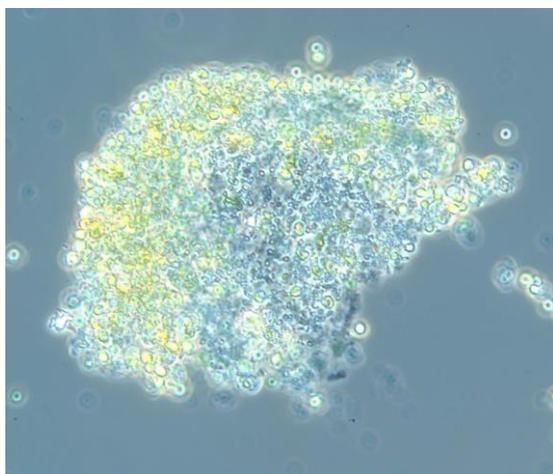


Abbildung 7.18: Aggregierte Zellen bei einer 25-fachen Eisenkonzentration

### 7.3.4 Reaktorkultivierungen

#### Verlauf der Zell- und Coccolithen-Konzentrationen

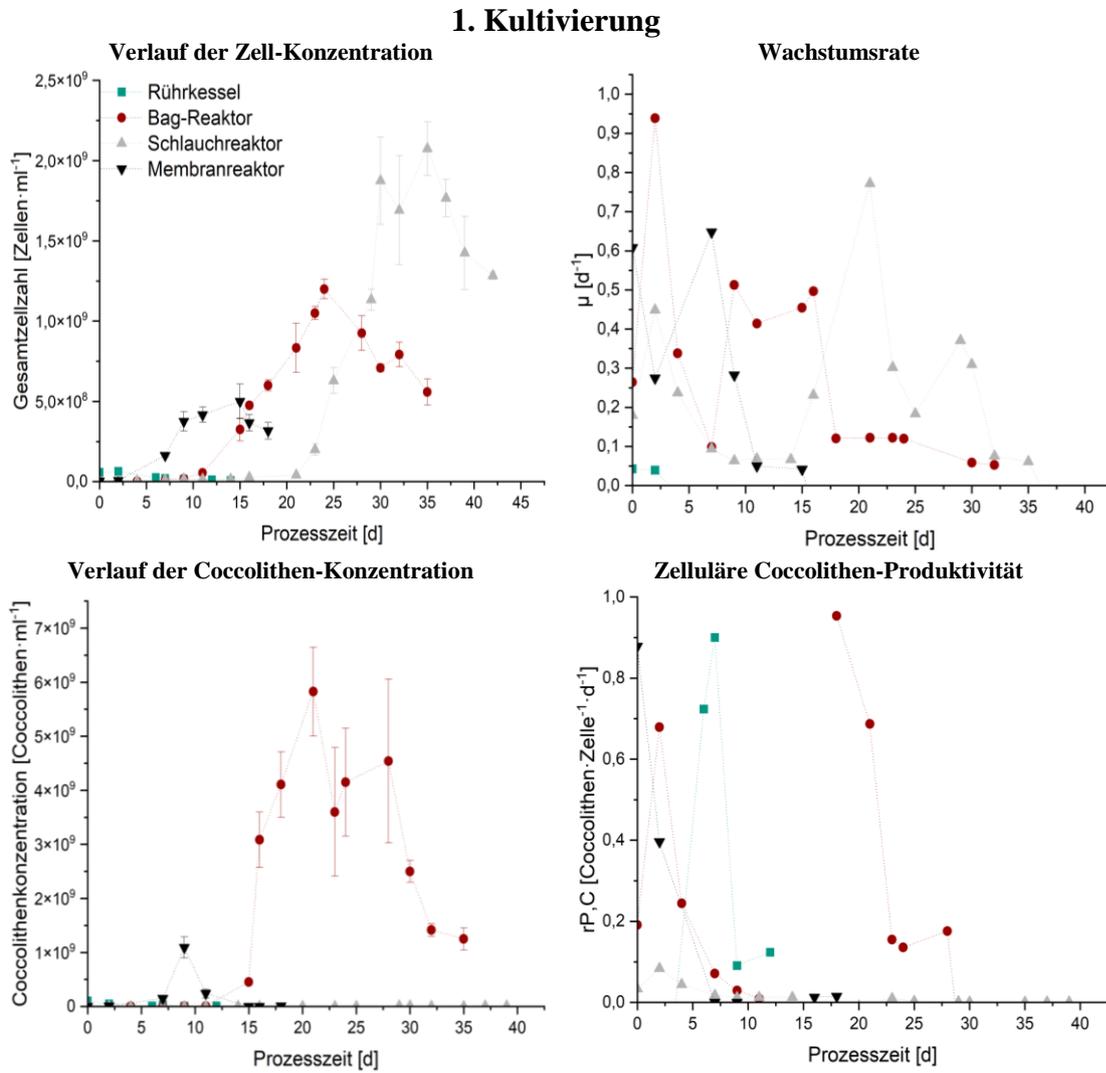


Abbildung 7.19: Links: Verlauf der Zell- und Coccolithen-Konzentration. Rechts: Verlauf der Wachstumsrate und der Coccolithen-bildungsrate während der ersten Kultivierung in vier verschiedenen Reaktorsystemen

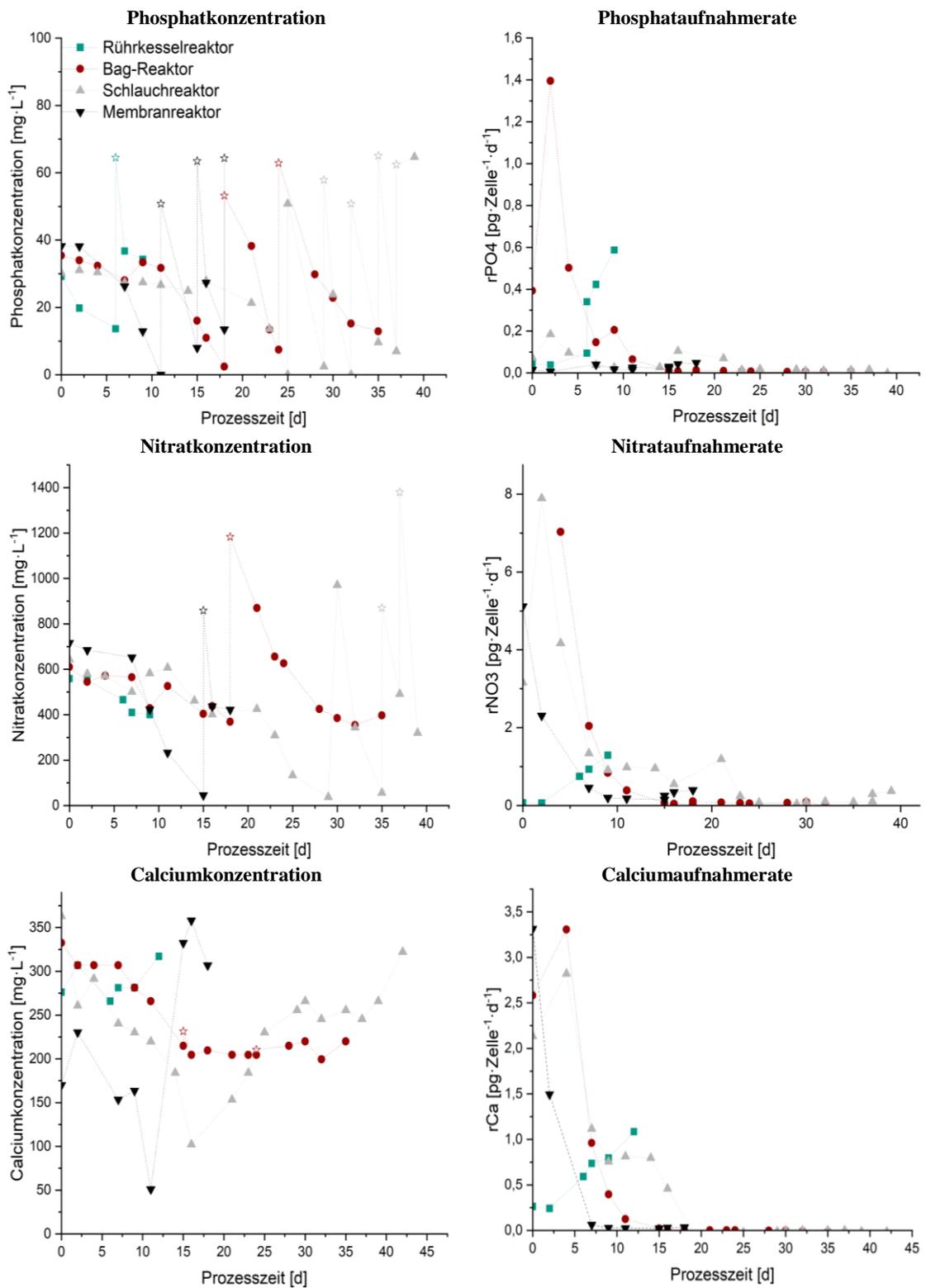


Abbildung 7.20: Erste Kultivierungsversuche. Links: Konzentrationsverläufe von Phosphat, Nitrat und Calcium. Rechts: Verlauf der Nährstoffverbrauchsrate. Sternsymbole kennzeichnen die Tage, an denen die Nährstoffe nachgefüllt wurden.

Während der Kultivierungen wurden regelmäßig Phosphat und Nitrat bei einem Absinken unter 10 % der Ausgangskonzentration nachgefüttert. Die Konzentrationen wurden dann, erst auf 110 % und danach 120 % aufgefüllt. Das entnommene Füllvolumen wurde mit einer doppelkonzentrierten Salzlösung ausgeglichen. Aufgrund technischer Probleme wurden die Proben von Tag 9 des Rührkesselreaktors, Tag 18 des Membranreaktors und die Tage 35, 37 und 39 des Schlauchreaktors vor der Filtration eingefroren und danach erst vermessen. Dadurch kann es zu ungewollten Messabweichungen kommen.

## 2. Kultivierung

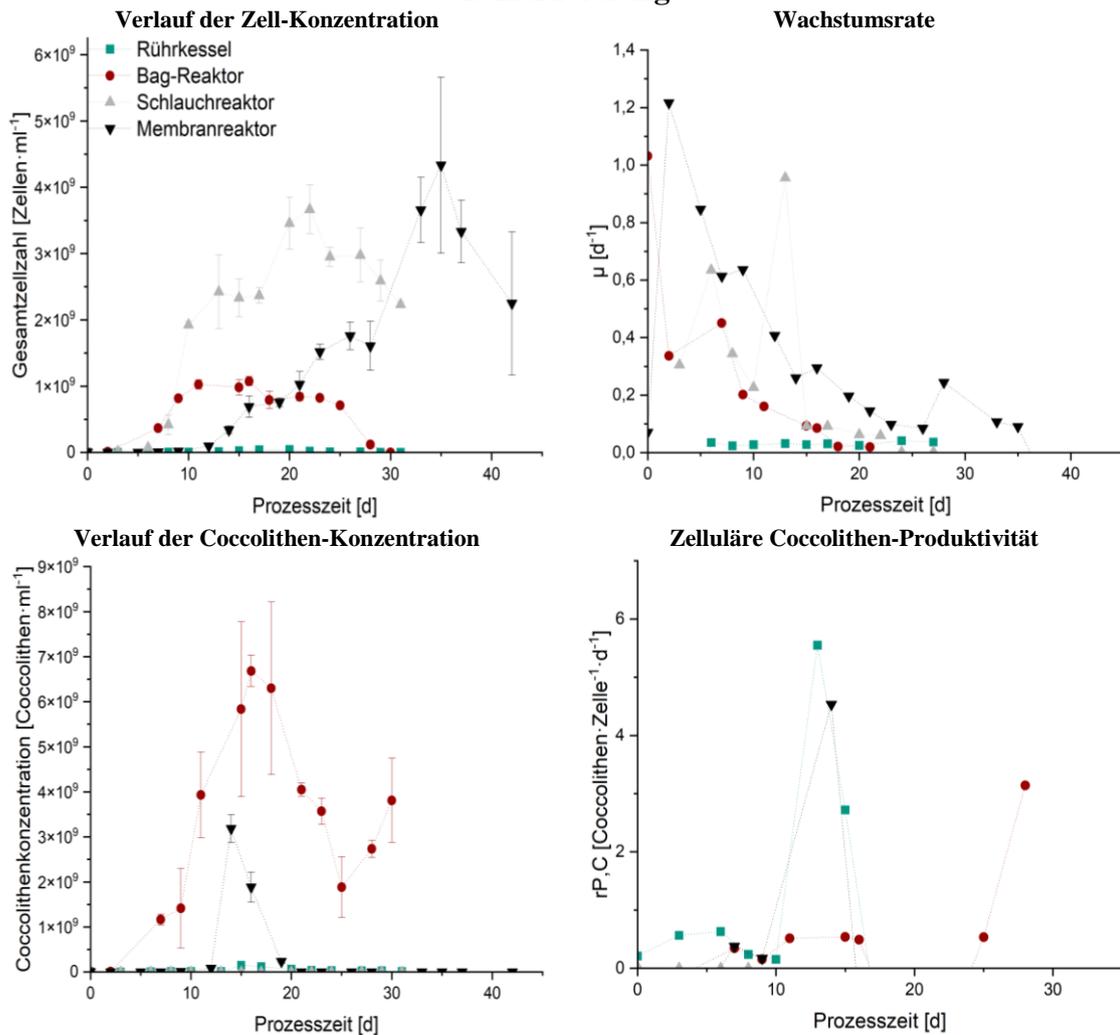


Abbildung 7.21: Links: Verlauf der Zell- und Coccolithen-Konzentration. Rechts: Verlauf der Wachstumsrate und der Coccolithen-bildungsrate während der zweiten Kultivierung in vier verschiedenen Reaktorsystemen

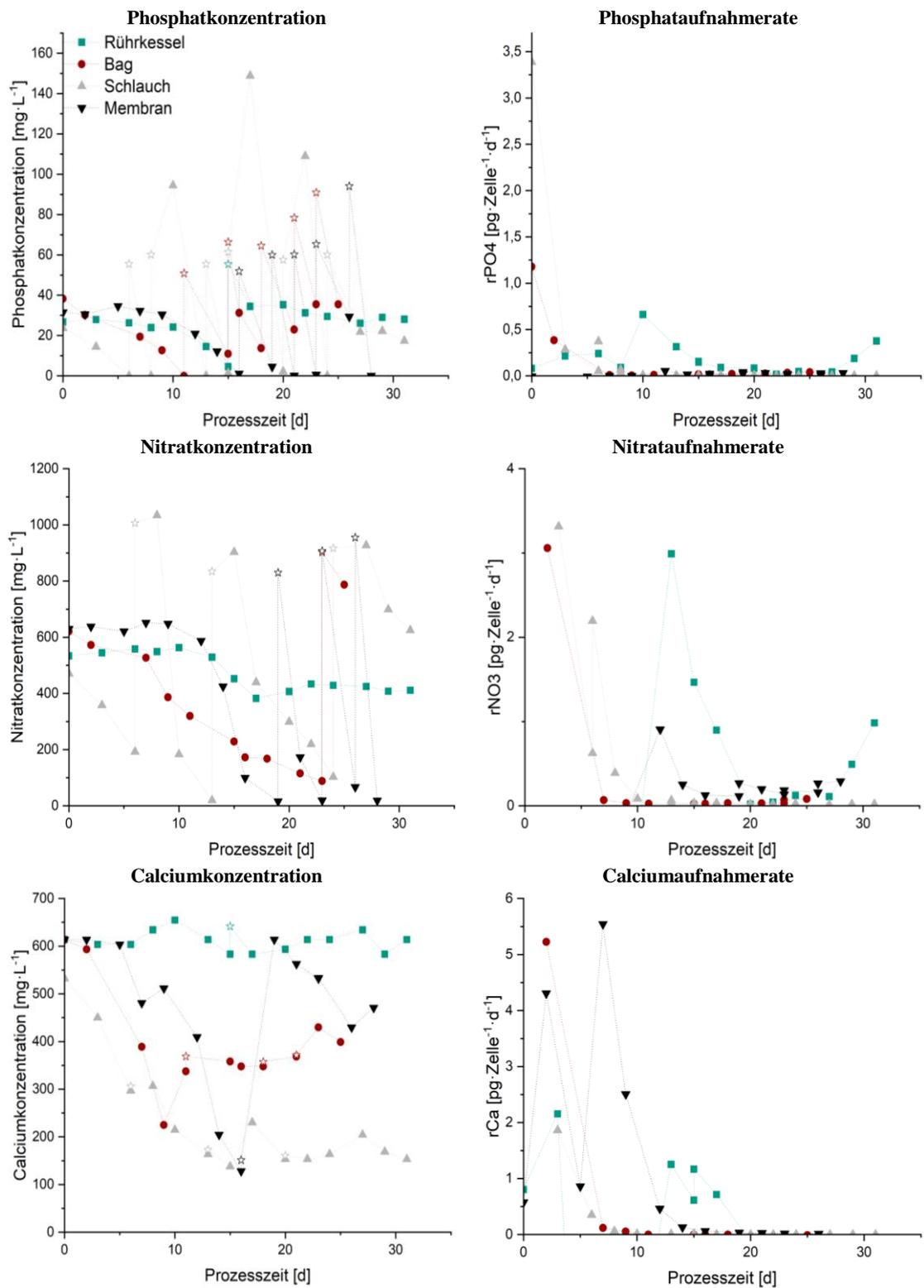


Abbildung 7.22: Zweite Kultivierungsversuche. Links: Konzentrationsverläufe von Phosphat, Nitrat und Calcium. Rechts: Verlauf der Nährstoffverbrauchsrate. Sternsymbole kennzeichnen die Tage, an denen die Nährstoffe nachgefüllt wurden

Nach einem Abfall der Nährstoff-Konzentration unter 10 % der Ausgangskonzentration, wurden die Konzentrationen erst auf 110 % und anschließend auf 120 % und 130 % erhöht.

### Der Rührkesselreaktor

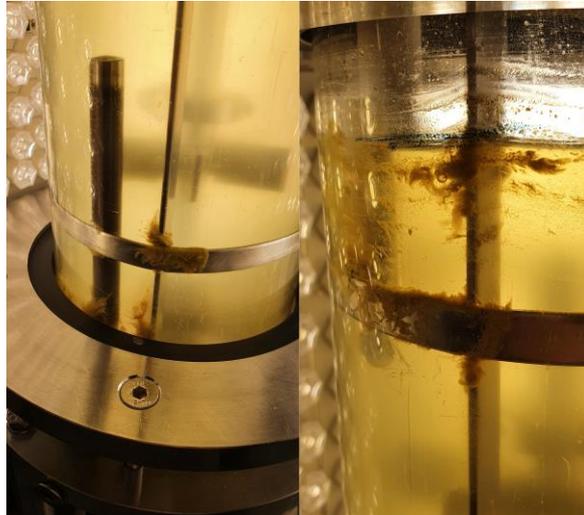


Abbildung 7.23: Zellablagerungen während der Kultivierung im Rührkesselreaktor

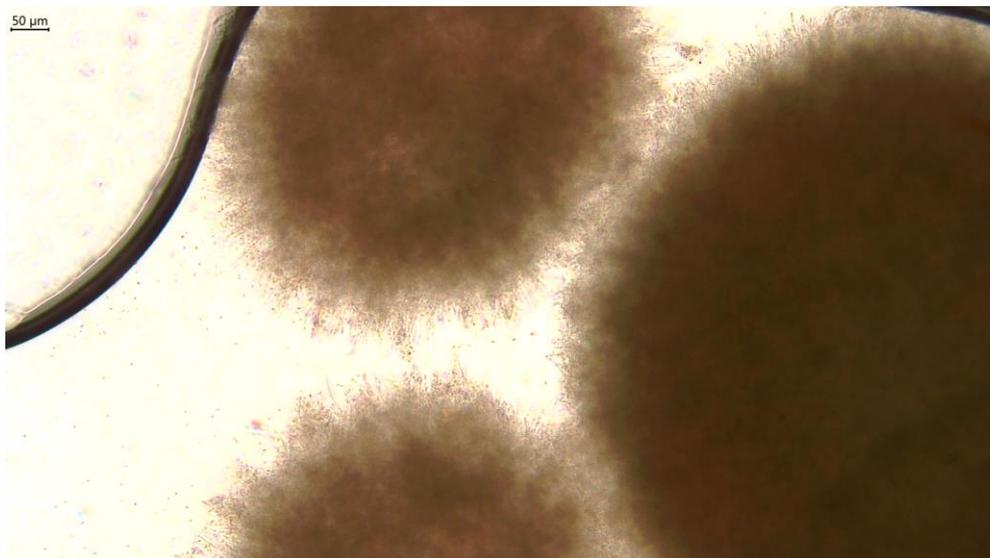


Abbildung 7.24: Kontamination während der zweiten Reaktorkultivierung unter dem Mikroskop (10x Vergrößerung)

## Der Schlauchreaktor



Abbildung 7.25: Ablagerungen im Schlauchreaktor

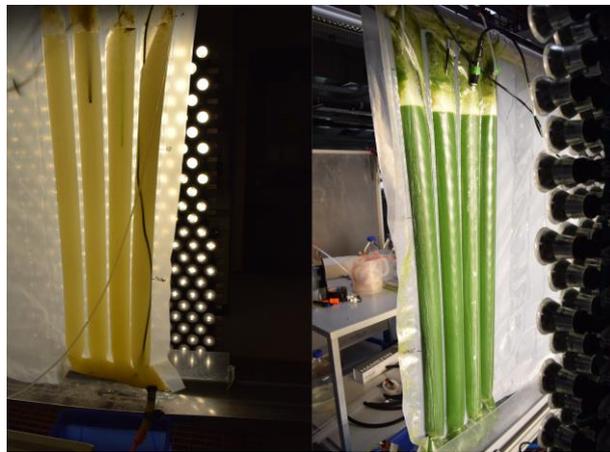


Abbildung 7.26: Veränderung der Kulturbrühe während der Kultivierung im Schlauchreaktor

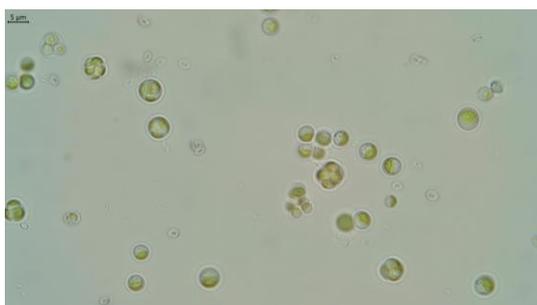


Abbildung 7.27: Mikroskopische Aufnahme der Zellen ohne Coccosphäre aus dem Schlauchreaktor. Freie Coccolithen konnten beobachtet werden

## 7 Anhang



Abbildung 7.28: Mikroskopische Aufnahme der entnommenen nicht-kalzifizierte Zellen aus dem Schlauchreaktor nach 18 Tagen Inkubation im Schüttelkolben

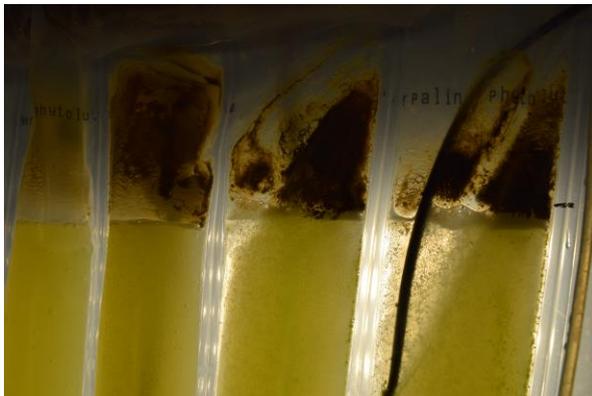


Abbildung 7.29: Schaumbildung und die dadurch resultierenden Zellablagerungen im Schlauchreaktor



Abbildung 7.30: Bestimmung der Makromischzeit des Schlauchreaktors: Links: nach 3 Stunden. Rechts: Nach 16 Stunden. Die Sättigung der Farben wurde verstärkt

### Der Membranreaktor



Abbildung 7.31: Zellansammlungen zwischen Reaktorwand und Kühlschlange im Membranreaktor



Abbildung 7.32: Kontamination im Membranreaktor

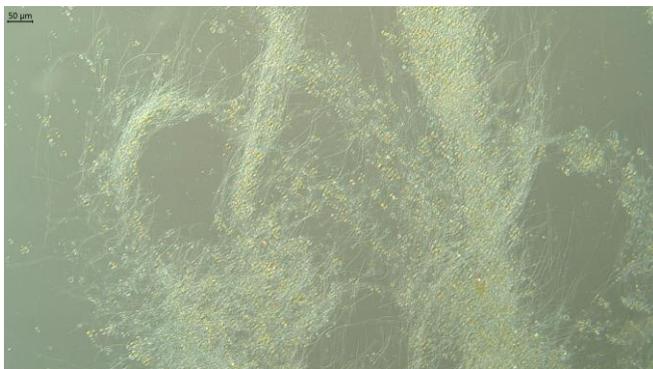


Abbildung 7.33: Kontamination des Membranreaktors unter dem Mikroskop

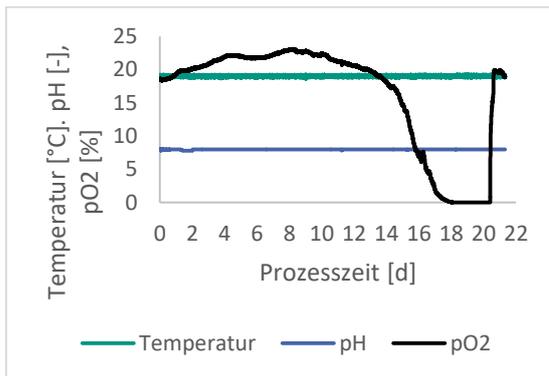


Abbildung 7.34: Verlauf der Temperatur, des pH-Wertes und des  $p_{O_2}$ -Gehaltes während der ersten Kultivierung im Membranreaktor.

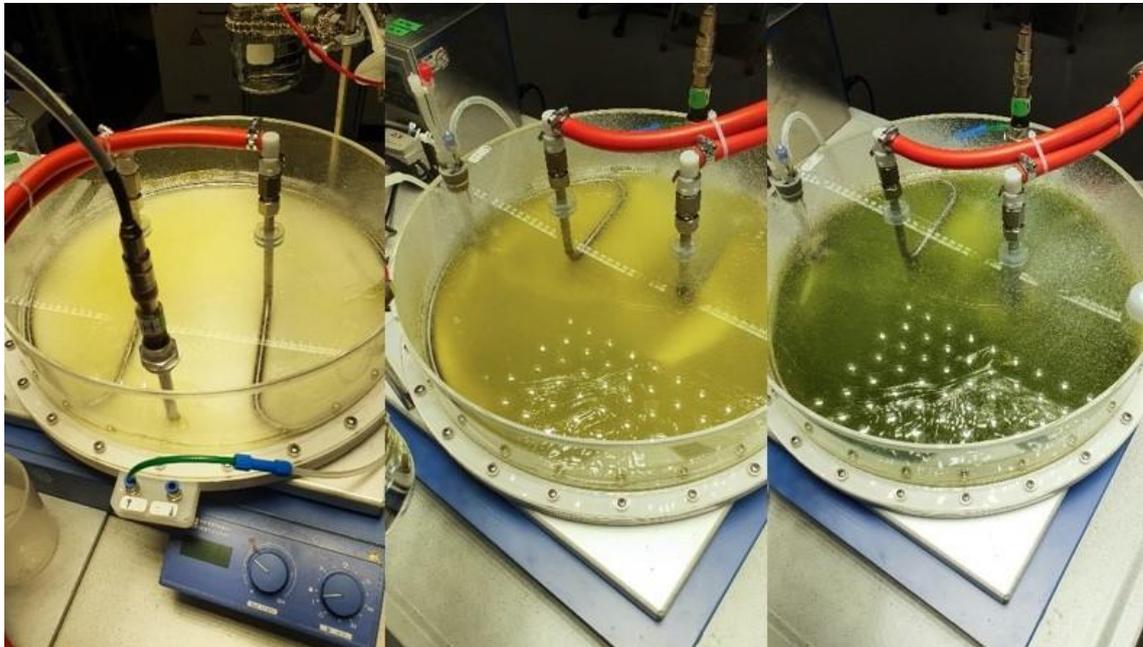


Abbildung 7.35: Farbumschlag während der zweiten Kultivierung mit dem Membranreaktor

**Semi-kontinuierlicher Betrieb**

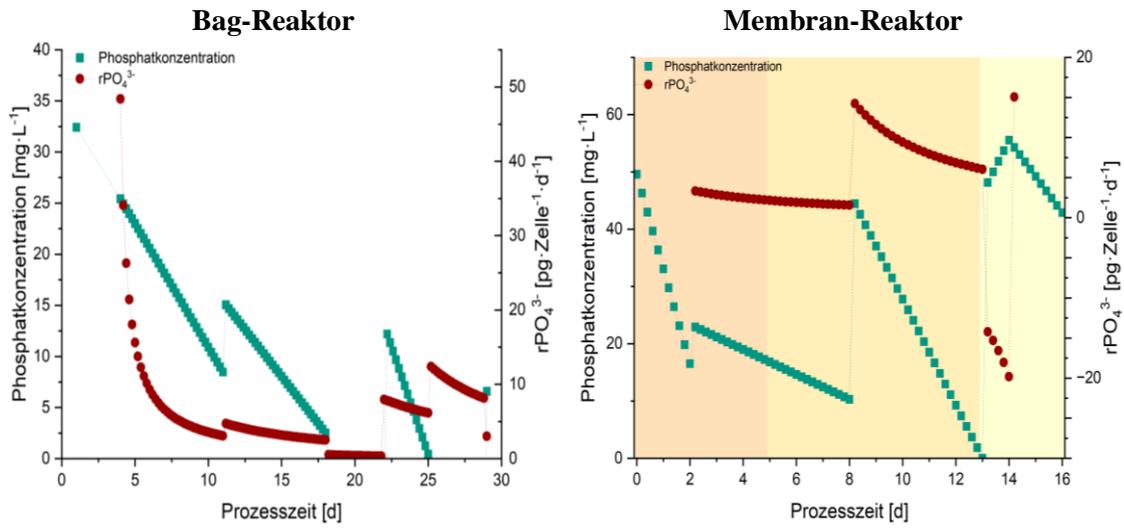


Abbildung 7.36: Verlauf der Phosphatkonzentration (grün) und der Phosphataufnahmerate (blau) während der semi-kontinuierlichen Versuche im Bag- und Membranreaktor

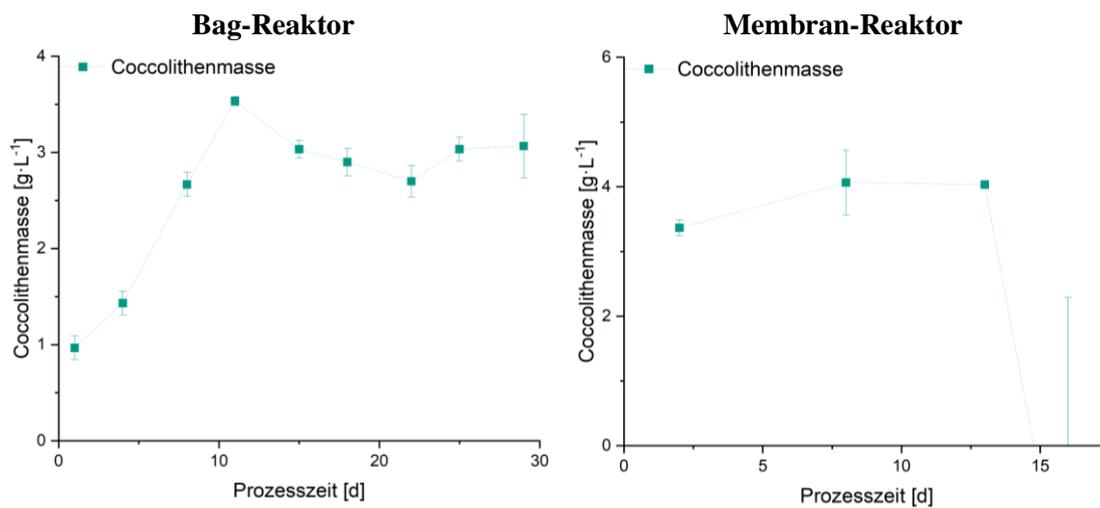


Abbildung 7.37: Verlauf der Coccolithenmasse während der semi-kontinuierlichen Versuche im Bag- und Membranreaktor