

Charakterisierung der parasitischen Infektion  
mit *Amoebophilidium protococcarum* in Mikroalpengemeinschaften

## DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin/eines  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
in der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und  
Naturwissenschaften (BayNAT)  
der Universität Bayreuth

vorgelegt von

***Anna-Lena Höger***

aus *Schweinfurt*

Bayreuth, 2022

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von März 2017 bis Juni 2022 am Fachbereich für angewandte Biowissenschaften und Prozesstechnik der Hochschule Anhalt unter Betreuung von Frau Prof. Dr. Griehl und Herrn Prof. Dr. Matthias Noll von der Hochschule für angewandte Wissenschaften Coburg angefertigt.

*Vollständiger Abdruck der von der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften (BayNAT) der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin/ eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).*

Dissertation eingereicht am: 15.06.2022

Zulassung durch das Leitungsgremium: 15.07.2022

Wissenschaftliches Kolloquium: 17.01.2023

Amtierender Direktor: Prof. Dr. Hans Keppler

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Matthias Noll (Gutachter)

Prof. Dr. Andreas Römpf (Gutachter)

Prof. Dr. Gerhard Rambold (Gutachter)

Prof. Dr. Tillmann Lüders (Vorsitz)

Prof. Dr. Carola Griehl



# Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung .....	8
Abstract .....	10
1 Einleitung und Grundlagen .....	13
1.1 Problemstellung und Motivation .....	13
1.2 Industrielle Kultivierung von Mikroalgen .....	15
1.3 Kontaminationsproblematik in industriellen Mikroalgenanlagen.....	18
1.3.1 Parasitische Wasserpilze .....	19
1.3.2 Bakterielle Gemeinschaft .....	24
1.4 Molekularbiologische Analytik von Mikroalgengemeinschaften .....	28
1.4.1 Amplicon-Sequenzierung zur Entschlüsselung der mikrobiellen Diversität .....	29
1.4.2 Metaproteomik zur Untersuchung von Mikroalgengemeinschaften.....	30
1.4.3 Berechnung mikrobieller Netzwerke auf Basis von Omics-Datensätzen.....	31
1.5 Kontaminationsmanagement in industriellen Mikroalgenanlagen .....	32
1.5.1 Detektion von biologischen Kontaminanten.....	33
1.5.2 Kuratives Kontaminationsmanagement.....	34
1.5.3 Präventives Kontaminationsmanagement .....	35
1.6 Hypothesen und Forschungsfragen .....	38
2 Material und Methoden .....	40
2.1 Materialien .....	40
2.2 Analytische Methoden.....	46
2.2.1 Kultivierung von Mikroalgen und Aphelidien .....	46
2.2.2 Bestimmung des Trockensubstanzgehaltes .....	48
2.2.3 Bestimmung der Nährstoffkonzentration .....	48
2.2.4 Photometrische Bestimmung der optische Dichte und Chlorophyll-Fluoreszenz.....	48
2.2.5 Mikroskopische Bestimmung von Zellzahl und Detektion von Aphelidien .....	49
2.2.6 Berechnung der Pathogenität und Virulenz von infizierten Algenkulturen.....	50
2.2.7 DNA-Extraktion und Qualitätskontrolle .....	52
2.2.8 PCR und Sequenzierung von Aphelidien-DNA.....	53

2.2.9	16S-rRNA Illumina Sequenzierung und Sequenzdatenanalyse .....	54
2.2.10	Multivariate Analyse der Zusammensetzung der Mikroalggemeinschaft.....	54
2.2.11	Analyse des potenziellen Funktionsprofils des bakteriellen Mikrobioms .....	55
2.2.12	Netzwerkeanalyse der bakteriellen Mikroalggemeinschaft.....	56
2.2.13	Protein-Extraktion, Proteinquantifizierung und tryptischer Verdau .....	56
2.2.14	Massenspektrometrische Analyse von Proteinextrakten.....	59
2.2.15	Statistische Analyse der Metaproteomdaten .....	60
2.3	Experimenteller Aufbau.....	62
2.3.1	Charakterisierung des Aphelidien-Inokulums .....	62
2.3.2	Wirtsspezifität von <i>A. protococcarum</i> .....	63
2.3.3	Kontaminationsexperiment.....	64
2.3.4	Proteomexperiment.....	65
2.3.5	Behandlungsexperiment 1: Erhöhung der Alggendiversität .....	66
2.3.6	Behandlungsexperiment 2: Änderung der abiotischen Kultivierungsparameter ..	67
2.3.7	Behandlungsexperiment 3: Co-Kultivierung mit protektiven Bakterien.....	68
3	Ergebnisse .....	70
3.1	Charakterisierung des parasitischen Aphelidien-Stammes AI15TR.....	70
3.1.1	Mikroskopische Beobachtungen des Aphelidien-Stammes AI15TR .....	70
3.1.2	Molekularbiologische Charakterisierung des Aphelidien-Stammes AI15TR.....	73
3.1.3	Analyse des Algg-Wirtsspektrums von <i>A. protococcarum</i> AI15TR.....	74
3.2	Infektionsverlauf in Mikroalggkulturen .....	75
3.2.1	Untersuchung des Infektionsverlaufes bei verschiedenen Alggenspezies in offener und steriler Kultivierungsumgebung.....	75
3.3	Mikrobielle Gemeinschaft in infizierten Mikroalggkulturen .....	79
3.3.1	Diversität der bakteriellen Mikroalgggemeinschaft.....	79
3.3.2	Taxonomische Zusammensetzung der bakteriellen Mikroalgggemeinschaft ...	82
3.3.3	Funktionelle Analyse der bakteriellen Mikroalgggemeinschaft.....	85
3.3.4	Interaktionsmuster der bakteriellen Mikroalgggemeinschaft .....	86
3.4	Funktionelle Analyse der Aphelidien-Infektion.....	89

3.4.1	Verlauf der Aphelidien-Infektion .....	89
3.4.2	Metaproteomische Zusammensetzung der Mikroalpengemeinschaft .....	89
3.4.3	Funktionelle Analyse der Mikroalpengemeinschaft.....	93
3.5	Präventive Behandlungsstrategien gegen Aphelidien-Infektionen .....	98
3.5.1	Infektionsverlauf bei verschiedenen Algen-Polykulturen in verschiedenen Diversitätsstufen .....	98
3.5.2	Einfluss von abiotischen Kultivierungsparametern auf den Infektionsverlauf ...	102
3.5.3	Einfluss von bakteriellen Co-Kulturen auf den Infektionsverlauf .....	104
4	Diskussion .....	107
4.1	Charakterisierung der Algeninfektion mit <i>A. protocoocarum</i> AI15TR .....	107
4.1.1	Identifikation von <i>A. protocoocarum</i> AI15TR.....	107
4.1.2	Pathogenität von <i>A. protocoocarum</i> AI15TR.....	108
4.1.3	Virulenz von <i>A. protocoocarum</i> AI15TR.....	109
4.2	Mikrobielle Gemeinschaft in infizierten Mikroalgenkulturen .....	111
4.2.1	Wirtsalgenspezifische Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft.....	111
4.2.2	Auswirkung der Kultivierungsumgebung auf die bakterielle Gemeinschaft .....	112
4.2.3	Auswirkung der Aphelidien-Infektion auf die bakterielle Gemeinschaft.....	113
4.3	Metaproteom-Analyse von infizierten Mikroalgenkulturen .....	115
4.3.1	Interaktion von <i>S. vacuolatus</i> und <i>A. protocoocarum</i> auf Proteinebene.....	115
4.3.2	Reaktion der bakteriellen Mikroalpengemeinschaft auf die Aphelidien-Infektion von <i>S. vacuolatus</i> .....	117
4.4	Präventive Strategien zur Kontrolle von Aphelidien-Infektionen .....	119
4.4.1	Diversitätssteigerung in Polykulturen.....	119
4.4.2	Anpassung der abiotischen Kultivierungsparameter .....	121
4.4.3	Co-Kultivierung mit bakteriellen Protektorstämmen .....	122
5	Fazit und Ausblick .....	124
6	Verzeichnisse .....	127
6.1	Literaturverzeichnis.....	127
6.2	Abkürzungsverzeichnis .....	150
6.3	Abbildungsverzeichnis .....	152

6.4	Tabellenverzeichnis .....	155
7	Anhang .....	156
7.1	Ergänzende Informationen .....	156
7.1.1	Illumina Sequenzierung und Amplikon-Datenverarbeitung .....	156
7.1.2	Sequenz des PCR-Produkts aus dem Primerpaar UF1/AU4 (1287 bp) .....	157
7.1.3	Sequenz des PCR-Produkts aus dem Primerpaar ITS1f/ITS4 (535 bp) .....	157
7.2	Ergänzende Abbildungen .....	158
7.3	Ergänzende Tabellen .....	161
	Danksagung .....	168
	(Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen .....	171

## Kurzfassung

In den letzten Jahren hat die Nachfrage nach Mikroalgenprodukten auf dem Markt zugenommen, aber eine nachhaltige industrielle Produktion wird immer noch durch die biologische Stabilität der Produktionsanlagen im großen Maßstab beschränkt. Die Beziehungen zwischen Algenwirten, dem zugehörigen Mikrobiom und parasitischen Kontaminanten in Photobioreaktoren sind jedoch noch weitgehend unerforscht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der bisher unbekannte parasitäre Aphelidien-Stamm AI15TR charakterisiert und Untersuchungen zum Infektionsverlaufs bei verschiedenen Mikroalgenarten und deren zugehörigen bakteriellen Mikrobiomen vorgenommen, sowie präventive Methoden zur Bekämpfung der parasitären Algeninfektion erprobt.

Der bis dato unbekannte parasitische Wasserpilz AI15TR, der 2013 erstmalig in Tannenbaumreaktoren des Biosolarzentrums an der Hochschule Anhalt auftrat, konnte sowohl anhand der charakteristischen morphologischen Merkmale und des typischen Lebenszyklus sowie der 18S rRNA Gen-Sequenz eindeutig der Spezies *Amoebophilidium protococcarum* zugeordnet werden. Wie andere Aphelidien weist *A. protococcarum* AI15TR ein sehr spezifisches Pathogenitätsmuster auf. Die höchste Virulenz wurde bei Vertretern der Familie Scenedesmaceae festgestellt, bei den Vertretern der Ordnung Chlorellales wurde eine verzögerte und abgeschwächte Virulenz festgestellt, während andere Grünalgenarten keine Infektion aufwiesen. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Anfälligkeit gegenüber einer Infektion mit *A. protococcarum* mit wachsender phylogenetischer Distanz zum Hauptwirt *S. vacuolatus* sinkt. Von der Kultivierungsumgebung blieb der Infektionsablauf hingegen weitestgehend unverändert.

Die Analyse des assoziierten bakteriellen Mikrobioms wurde mittels 16S rRNA Gen Amplikonsequenzierung vorgenommen. Die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaften wurde auf Phylum-Ebene bei allen untersuchten Algenwirten hauptsächlich von klassischen aquatischen Taxa wie  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien dominiert. Auf Gattungsebene wurde jedoch für jede Algenart eine unterschiedliche und stabile Komposition der bakteriellen Gemeinschaft beobachtet, sodass davon auszugehen ist, dass die Konsortien sehr eng an die jeweilige Algenspezies angepasst waren. Das mit *Scenedesmus vacuolatus* assoziierte Mikrobiom setzte sich hauptsächlich aus Vertretern der Gattungen *Hydrogenophaga* (17,1 %), *Sphingomonas* (15,0 %) und *Brevundimonas* (14,6 %) zusammen. Die bakterielle Gemeinschaft in *Chlorella sorokiniana* Kulturen zeichnete sich vornehmlich durch *Porphyrobacter* (49,7 %) und *Brevundimonas* (10,4 %) aus. *Desmodesmus quadricauda*-Kulturen wurden von den Gattungen *Sphingopyxis* (36,3 %), *Blastomonas* (23,2 %) und *Brevundimonas* (15,6 %) dominiert, wohingegen das Mikrobiom von *Botryococcus braunii* mehrheitlich aus *Porphyrobacter* (20,7 %), *Sphingopyxis* (15,5 %), and *Hydrogenophaga*



(13,2 %) bestand. Eine PERMANOVA-Analyse der  $\beta$ -Diversität basierend auf Bray-Curtis und gewichteten Unifrac Distanzen bestätigt, dass 58,6 % bzw. 41,1 % der Variabilität der Daten durch den Algenwirt erklärt werden können, während die Kulturbehandlung mit 7,7 % bzw. 8,7 % nur wenig Einfluss nimmt. Durch eine Infektion mit *A. protococcarum* AI15TR nahm die bakterielle Vielfalt in den Kulturen zu und die Struktur und Zusammensetzung der Gemeinschaften veränderten sich. Darüber hinaus konnte eine Verschiebung der potenziellen funktionellen Eigenschaften der Bakterien hin zu Funktionen, die mit Entgiftung, Öl-Bioremediation und Zellulolyse zusammenhängen, beobachtet werden.

Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Proteom-Analyse mittels nanoLC-MS/MS konnten die Annahmen zur funktionellen Veränderung der bakteriellen Gemeinschaft bestätigen. Es wurde ein deutlicher Anstieg der bakteriellen Proteinhäufigkeit, sowie eine starke Verschiebung der Funktionsprofile innerhalb der bakteriellen Gemeinschaft während der Infektion mit *A. protococcarum* AI15TR festgestellt. Die meisten Proteine, die häufiger in infizierten Algenkulturen gefunden wurden, waren mit Stoffwechselprozessen (ca. 55 %) von Aminosäuren, Lipiden, Coenzymen, Nukleotiden und Kohlenhydraten sowie der Energieproduktion assoziiert. Dieser Shift in infizierten Kulturen deutet darauf hin, dass die assoziierten Bakterien ihren Stoffwechsel anpassen, um neue Nährstoffe aus der absterbenden Algenbiomasse verarbeiten zu können. So wurden beispielsweise überexprimierte Proteine gefunden, die zum Abbau von Proteinen, zum Transport von Nährstoffen in die Zelle, zur Biosynthese von Aminosäuren und zur Erzeugung von Energie beisteuern. Des Weiteren wurden für mehrere Proteine, die mit pathogenen Interaktionen zwischen Bakterien und Pflanzen in Verbindung stehen, erhöhte Abundanzen detektiert. Diese funktionellen Verschiebungen deuten darauf hin, dass Mitglieder der Bakteriengemeinschaft, die in nicht infizierten Algenkulturen an synergistischen Interaktionen beteiligt sind, zu opportunistischen Lebensweisen übergehen, sobald die Algenkultur von *A. protococcarum* infiziert wird und dazu beitragen, verletzte oder abgestorbene Algenzellen zu zersetzen.

Die Ergebnisse der Behandlungsexperimente konnten zeigen, dass Aphelidien-Infektionen durch abiotische Kultivierungsfaktoren wie anoxische Dunkelphasen, um 82 % verlangsamt werden konnten. Des Weiteren wurde gezeigt, dass auch biotische Interaktionen einen deutlichen Einfluss auf den Verlauf auf Aphelidien-Infektionen haben können. Mehrere Artenkombinationen wiesen eine ähnlich gute Produktivität wie die untersuchte *S. vacuolatus*-Monokultur auf und gleichzeitig wurde eine deutlich geringere Auswirkung der Infektion mit *A. protococcarum* AI15TR beobachtet. Auch durch den Einsatz sorgfältig ausgewählter bakterieller Konsortien ist eine Verbesserung der Stabilität von Produktionssystemen möglich. Durch die Co-Kultivierung von *S. vacuolatus* mit *Pseudomonas protegens* konnte eine um 93 ( $V_{750}$ ) bzw. 68 ( $V_{685}$ ) Prozentpunkte verminderte Virulenz, sowie eine extreme Verzögerung der Infektion um 365 % erreicht werden.

## Abstract

In recent years, the market demand for microalgal products has increased, but sustainable industrial production is still troubled by the biological stability of large-scale production plants. However, the relationships between algal hosts, the associated microbiome and pathogens in photobioreactors are still largely unexplored. In this work, the parasitic strain AI15TR was characterized and an investigation on the infection in different microalgal species and their associated bacterial microbiomes was performed, as well as preventive methods to control the parasitic infection were tested.

The previously unknown aphelid strain AI15TR, which first appeared in 2013 in the christmasreef reactors of the Biosolar Center at Anhalt University of Applied Sciences, could be assigned to the species *Amoebophilidium protococcarum* based on both the characteristic morphological features and the typical life cycle as well as the 18S rRNA gene sequence. Like other aphelids, *A. protococcarum* AI15TR exhibits a very specific pathogenicity pattern. The most severe infestation was observed in representatives of the family Scenedesmaceae, delayed and attenuated virulence was observed in representatives of the order Chlorellales, while other green algal species showed no signs of infection. The results indicate that susceptibility to *A. protococcarum* infection decreases with increasing phylogenetic distance from the main host *S. vacuolatus*. The course of infection remained largely unchanged from the cultivation environment.

Analysis of the associated bacterial microbiome was performed by 16S rRNA gene amplicon sequencing. The bacterial community compositions were mainly dominated by classical limnic taxa such as  $\alpha$ - and  $\gamma$ -proteobacteria for all algal hosts studied. However, at the genus level, different and stable bacterial community compositions were observed for each algal species, suggesting that the consortia were very distinctly adapted to each algal species. The microbiome associated with *Scenedesmus vacuolatus* was mainly composed of operational taxonomic units (OTUs) of the genera *Hydrogenophaga* (17.1 %), *Sphingomonas* (15.0 %) and *Brevundimonas* (14.6 %). In contrast, the bacterial community in *Chlorella sorokiniana* cultures was characterized primarily by representatives of the genera *Porphyrobacter* (49.7 %) and *Brevundimonas* (10.4 %). *Desmodesmus quadricauda* cultures were dominated by the genera *Sphingopyxis* (36.3 %), *Blastomonas* (23.2 %), and *Brevundimonas* (15.6 %), while the bacterial community of *Botryococcus braunii* was composed of a majority of *Porphyrobacter* (20.7 %), *Sphingopyxis* (15.5 %), and *Hydrogenophaga* (13.2 %). A PERMANOVA analysis of  $\beta$ -diversity based on Bray-Curtis and weighted Unifrac distances confirmed that 58.6 % and 41.1 % of the variability in the data could be explained by the algal host, while culture treatment only had little effect, at 7.7 % and 8.7 %, respectively. Infection with *A. protococcarum* AI15TR

increased bacterial diversity in the cultures and community structure and composition changed during the course of infection. Moreover, a shift in the potential functional properties of bacteria towards functions related to detoxification, oil bioremediation and cellulolysis was observed.

The results of mass spectrometric proteomic analysis by nanoLC-MS/MS were able to confirm the initial assumptions on the functional change of the bacterial community. A significant increase in bacterial protein abundance, as well as a strong shift in functional profiles within the bacterial community during infection with *A. protocoocarum* AI15TR compared to uninfected *S. vacuolatus* cultures, was detected. Most proteins found more abundantly in infected algal cultures were associated with various metabolic processes (approximately 55 %). This shift suggests that the associated bacteria adapt their metabolism to process new nutrients from the dying algal biomass. For example, overexpressed proteins were found to contribute to protein degradation, transport of nutrients into the cell, biosynthesis of amino acids, and generation of energy and biosynthetic components. Furthermore, increased abundances were detected for several proteins associated with pathogenic interactions between bacteria and plants. These functional shifts suggest that members of the bacterial community involved in synergistic interactions in healthy algal cultures shift to opportunistic lifestyles once the algal culture becomes infected by *A. protocoocarum* and then contribute to decomposing injured or dead algal cells.

The results of the treatment experiments were able to show that infection with *A. protocoocarum* AI15TR could be reduced by 82 % by the adaption of abiotic cultivation factors, such as anoxic dark phases. Furthermore, it was shown that biotic interactions can also have a significant impact on the progression to aphelid infections. Several algal species combinations in mixed cultures demonstrated similar productivities as a *S. vacuolatus* monoculture and at the same time exhibited lower virulence of infection with *A. protocoocarum*. These results support the hypothesis that diverse polycultures can provide a more stable production than monocultures over a longer period of time. Furthermore, the use of carefully selected bacterial consortia can also improve the stability of production systems. Co-culturing *Pseudomonas protegens* with *S. vacuolatus* resulted in 93 ( $V_{750}$ ) and 68 ( $V_{685}$ ) percentage points of reduced virulence over 14 days, as well as an extreme delay in infection of 365 %.



# 1 Einleitung und Grundlagen

Die Nutzung von Algen bietet großes Potenzial zur Lösung globaler Probleme wie der Energiekrise, globalen Erwärmung oder Mangelernährung beizutragen (Deviram *et al.* 2020). Darüber hinaus weist die Herstellung von Mikroalgenprodukten eine große wirtschaftliche Bedeutung für die Aquakultur sowie einen steigenden Absatz in der Lebensmittelindustrie auf und bietet ein breites Anwendungsgebiet von hochpreisigen Wertstoffen in der Pharma- und Kosmetikindustrie (Borowitzka 2013). Darüber hinaus weckte die Herstellung von Biokraftstoffen aus Mikroalgen vor einigen Jahren großes Interesse als potenzielle Alternative zu fossilen Brennstoffen (Brennan und Owende 2010; Chisti 2008; Larkum *et al.* 2012).

## 1.1 Problemstellung und Motivation

Um das volle Potenzial der Mikroalgen-Biotechnologie ausschöpfen zu können, ist unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten ein kosteneffektives Kultivierungssystem nötig. Trotz intensiver wissenschaftlicher und industrieller Forschungsaktivität der letzten Jahrzehnte stellt es für die industrielle Produktion von Algenbiomasse immer noch ein Problem dar, große Volumina zu rentablen Kosten herzustellen (Rawat *et al.* 2013; Singh *et al.* 2014). Neben hohen energetischen und finanziellen Kosten zur Gewährleistung optimaler Kultivierungsbedingungen, Ernte- und Downstream-Prozessen (Brennan und Owende 2010; Wang *et al.* 2014), stellt die hohe Anfälligkeit für biologische Kontaminationen eine maßgebliche Herausforderung für die nachhaltige Produktion von Mikroalgenbiomasse im großen Maßstab dar (Carney und Lane 2014; Kazamia *et al.* 2012b; Molina-Grima *et al.* 2022; Scott *et al.* 2010; Wang *et al.* 2013). Biologische Instabilität, also Schwankungen der Produktivität der Kulturen bedingt durch den Eintrag von schädlichen Organismen, kann nicht nur zu Produktionseinbußen führen, sondern auch komplette Ernteaufälle zur Folge haben. Trotz der Gefahr hoher wirtschaftlicher Einbußen, wird der Kontaminationsproblematik häufig nur wenig Aufmerksamkeit geschenkt.

Eine axenische, also völlig sterile Handhabung von Mikroalgenkulturen, ist im technischen Maßstab weder aus ökonomischer noch praktischer Sicht sinnvoll, sodass sich bei längerem Betrieb künstliche dynamische Ökosysteme in Produktionsanlagen bilden (Cooper und Smith 2015; Schenk *et al.* 2008). Algen sind auch in der natürlichen Umgebung stark mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften verknüpft, deren Interaktionsmuster durch Co-Existenz und gemeinsame evolutionäre Geschichte geformt wurden (Ramanan *et al.* 2016). In der Mikroumwelt der Phycosphäre kann sich ein weites Spektrum an mutualistischen, kommensalistischen, antagonistischen, kompetitiven oder parasitischen Interaktionen entwickeln (Cirri und Pohnert 2019; Kazamia *et al.* 2016; Ramanan *et al.* 2016; Seymour *et al.*

2017). Besonders in offenen Anlagen, wie sogenannten ‚Open Ponds‘, die einem starken Einfluss der Umwelt ausgesetzt sind (Carney und Lane 2014; Letcher *et al.* 2013; Letcher *et al.* 2015), aber auch in geschlossenen, stark regulierten Systemen, können Kontaminationsprobleme mit diversen Organismen auftreten (Hoffman *et al.* 2008; Matthes 2020). Produktionseinbußen können sowohl von konkurrierenden Algenarten oder Bakterien, sowie durch ‚Abweiden‘ von räuberischen Zooplanktonspezies hervorgerufen werden. Darüber hinaus stellen Infektionen mit Viren oder parasitären Wasserpilzen wie Aphelidien eine häufige auftretende Problematik für Anlagenbetreiber dar. In den Tannenbaumreaktoren des Biosolarzentrums an der Hochschule Anhalt trat im Jahr 2013 ein bis dato unbekanntes parasitisches Algenpathogen auf, das das Wachstum verschiedenen Grünalgenarten konsequent eingeschränkt hat (Matthes 2020). Die Bestimmung des Algenparasiten AI15TR, die Auswirkung auf verschiedene Mikroalgengemeinschaften sowie die Entwicklung von Behandlungsansätzen zur Kontrolle des Parasiten stehen deshalb im Fokus dieser Arbeit. Konventionelles Kontaminationsmanagement besteht zumeist aus kurativen Methoden, die oftmals nur bedingt wirksam, aufwendig oder invasiv sind. Alternative präventive Ansätze und vielversprechende Methoden der synthetischen Ökologie und community engineering rücken in den letzten Jahren daher immer weiter in den Fokus der Forschung (Beyter *et al.* 2016; Jackrel *et al.* 2018; Kazamia *et al.* 2012a; Kazamia *et al.* 2014; Shurin *et al.* 2013; Smith und Crews 2014). Diese Ansätze zielen darauf ab, die mikrobielle Diversität und Spezieszusammensetzung zu steuern, um gleichzeitig sowohl die Stabilität und Resilienz als auch die Produktivität zu erhöhen. Bisher sind nur wenige Aspekte präventiver Maßnahmen untersucht und es fehlt an praktischen Umsetzungen für die industrielle Anwendung. Deshalb ist es zunächst wichtig, ein tiefgehendes Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen der Interaktionen von Mikroalgen und assoziierten Mikrobiomen sowie typischen Algenpathogenen zu erlangen. Dies beinhaltet die Charakterisierung von klassischen Algenparasiten und deren Auswirkung auf das Wachstum von Algenkulturen, sowie ein Verständnis der Interaktionen der komplexen mikrobiellen Gemeinschaft.

## 1.2 Industrielle Kultivierung von Mikroalgen

Zu den größten globalen Herausforderungen für die moderne Weltgemeinschaft gehören unter anderem die Bekämpfung von Armut, ein Mangel an Nahrungsmitteln und Trinkwasser, die Auswirkungen des Klimawandels sowie eine Verknappung von Energiereserven. Der Rückgang von Energiereichern sowie die global stetig steigenden CO<sub>2</sub>-Emissionswerte, die weiterhin vorrangig für die Klimaerwärmung verantwortlich gemacht werden, tragen maßgeblich zur Verschärfung dieser globalen Probleme bei (Bruckner *et al.* 2014; Stern 2006). Um die Auswirkungen des Klimawandels zu verringern, setzt sich die Klimarahmenkonvention der Vereinten Nationen neben weiteren Strategien zur Vermeidung des globalen Temperaturanstiegs die Verringerung der Treibhausgasemissionen zum Ziel. Als schnell nachwachsender Rohstoff bieten Mikroalgen zahlreiche ökologische Vorteile gegenüber fossilen Energieträgern und Biokraftstoffen aus konventionellen Pflanzen (Deviram *et al.* 2020). Dazu gehören sowohl die durch die Photosynthese bedingte positive CO<sub>2</sub>- und Klimabilanz als nachwachsender und biologisch abbaubarer Rohstoffes (Brune *et al.* 2009). Darüber hinaus konkurrieren Mikroalgen laut Borowitzka und Moheimani (2013b) nicht direkt mit der konventionellen Agrarwirtschaft um fruchtbare Anbauflächen oder Wasserressourcen, da für die Kultivierung vieler Arten die Nutzung von Meer- oder Abwasser möglich ist. Einige Mikroalgenarten weisen zusätzlich eine höhere Biomasseproduktivität, einen höheren prozentualen Öl-Anteil der Biomasse und deutlich kürzere Erntezyklen als konventionelle Biokraftstoffpflanzen auf (Borowitzka und Moheimani 2013b). Zusätzlich produzieren einige Arten neben Lipiden auch andere hochpreisige Nebenprodukte, wie Farbstoffe und medizinische Wirkstoffe (Borowitzka 2013). Aus diesem Kontext heraus können Mikroalgen eine entscheidende Rolle für zukünftige Strategien zur Reduktion von Kohlenstoffdioxid-Emission spielen und darüber hinaus zur Aufbereitung von Abwässern und Versorgung der Aquakultur-, Nahrungsmittel-, Gesundheits-, Kosmetik- und Pharmaindustrie mit biologischen, ökologischen und nicht-fossilen Wertstoffen beitragen (Borowitzka 2013; Borowitzka 2018; Borowitzka und Moheimani 2013a).

Für photoautotroph erzeugte Biomasse lag die weltweiten Produktionsmengen mit Stand 2017 bei ca. 30.000 t mit einem Umsatz von ca. 700 Mio. US-Dollar pro Jahr, bei Handelspreisen zwischen 13 und 120 US-Dollar kg<sup>-1</sup> (Hallmann und Rampelotto 2019). Weltweit gab es 2017 ca. 70 Mikroalgen-Produzenten (>1 ha ‚Open Pond‘ Fläche /10 m<sup>3</sup> Photobioreaktoren-Volumen) mit einem Schwerpunkt in Asien und Europa (Araújo *et al.* 2021). Der Großteil der weltweit produzierten Mikroalgenbiomasse beschränkt sich auf wenige industriell genutzt Spezies (Tabelle 1) und wird aufgrund der niedrigen Investitions- und Betriebskosten hauptsächlich in offenen Kultivierungssystemen wie ‚Open Ponds‘ erzeugt (Fernández *et al.* 2021).

**Tabelle 1: Jährliche industrielle Mikroalgenproduktion**

Phototroph produzierte Biomasse und Umsätze (Olaizola und Grewe 2019)

Gattung	Menge [t/a]	B2B Wert [US\$/kg]	Umsatz [US\$/a]
<i>Arthrospira</i>	18.000	13	234,000,000
<i>Chlorella</i>	9.500	25	237,500,000
<i>Dunaliella</i>	1.700	80	136,000,000
<i>Haematococcus</i>	300	120	36,000,000
<i>Nannochloropsis</i>	150	90	13,500,000
<i>Euglena</i>	50		38,500,000

Die produzierte Biomasse wird in Form von frischer Rohbiomasse (Algenslurry) und als getrocknete Pulver bzw. Tabletten, sowie in Form von extrahierten Wert- und Wirkstoffen vertrieben (Borowitzka 2018). Die Anwendungsbereiche der erzeugten Mikroalgenbiomasse umfassen sowohl eine energetische Nutzung als Biokraftstoffe, als auch eine stoffliche Nutzung in anderen Anwendungsbereichen (Borowitzka 2018; Borowitzka und Moheimani 2013a). In der Lebensmittelindustrie wird Mikroalgenbiomasse in der EU nach der Novel-Food-Verordnung als Rohstoff für Lebensmittel oder als Nahrungsergänzungsmittel in Form von Pulvern oder Tabletten eingesetzt, sowie als Zusatzstoff in Tierfuttermitteln verwendet (Kusmayadi *et al.* 2021). Im Aquakulturbereich werden ca. 20 verschiedene Mikroalgen als Lebendkultur oder in getrockneter Form zur Aufzucht von Fischen genutzt (Enzing *et al.* 2014). Die Kosmetikindustrie setzt auf die antimikrobiellen, antioxidativen und entzündungshemmenden Eigenschaften einiger Mikroalgenarten und verarbeitet sie in natürlichen Haut- und Körperpflegeprodukten (Yarkent *et al.* 2020). Der Marktsektor der Hochwertprodukte umfasst Carotinoide ( $\beta$ -Carotin und Astaxanthin), Phycobiliproteine (Phycocyanin) und mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure (Borowitzka 2013; Borowitzka 2018). Der Einsatz von Mikroalgen im pharmazeutischen Bereich befindet sich größtenteils noch in Entwicklung und hat bisher nur wenige zugelassene Anwendungsbeispiele hervorgebracht (Chang *et al.* 2021; Deeks 2019; Markham 2020; Rosales-Mendoza *et al.* 2020; Syed 2020). Für einen Markteintritt von algenbasierten Produkten sind die landesspezifischen und den jeweiligen Wirtschaftszweig betreffenden gesetzlichen Regularien entscheidend und stellen dabei eine Hürde für die steigende Entwicklung des Absatzmarktes für Mikroalgen dar.

Trotz der zahlreichen Anwendungsgebiete und Vorteile steht die industrielle Produktion von Mikroalgenprodukten neben den Hürden des Markteintritt vor weiteren großen Herausforderungen. Viele der beschriebenen Vorteile sind zwar im Labormaßstab reproduzierbar, lassen sich aber bis heute nicht auf einen industriellen Maßstab übertragen (Rawat *et al.* 2013). Als Hauptgründe dafür werden in der Literatur vor allem die starke

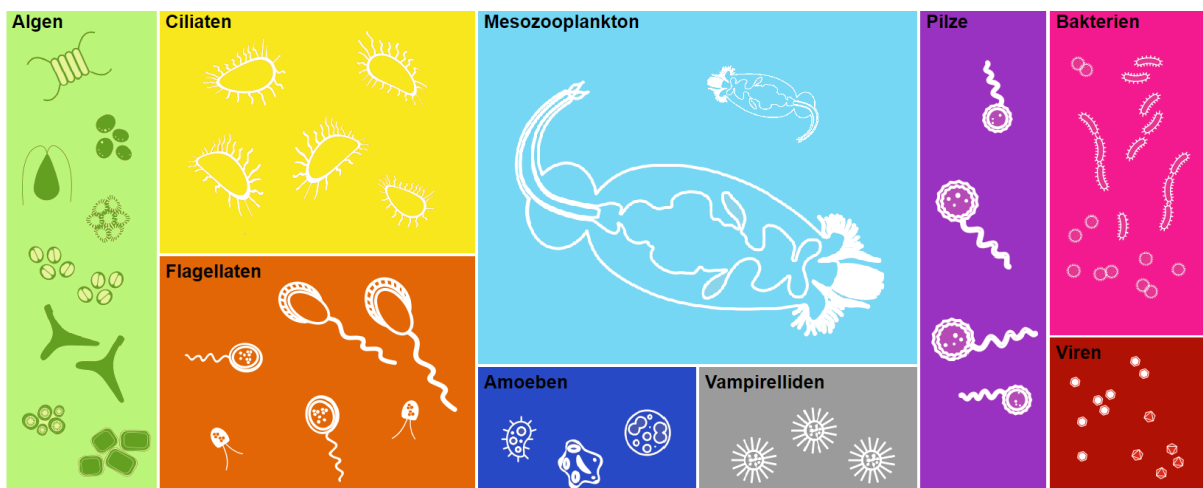


Abhängigkeit der Produktionsrate von äußeren Faktoren wie Belichtung, Temperatur, CO<sub>2</sub>- und Nährstoffzufuhr angeführt, die aus Kostengründen in vielen Kultivierungssystemen nicht optimal reguliert werden können. Darüber hinaus stellt der Energiebedarf (Durchmischung, Ernte, Aufarbeitung) zum Betrieb der Systeme und Prozesse, welche oft in einer negativen Energiebilanz resultieren, einen hohen Kostenfaktor dar (Brennan und Owende 2010). Einen weiteren entscheidenden und oft vernachlässigten Punkt stellen Kontaminationen mit Schadorganismen dar, die den Hauptgrund für Produktionsschwankungen ausmachen und dazu führen dass die theoretischen jährlichen Produktionsmengen vieler Anlagen nahezu nie ausgeschöpft werden können (Wang *et al.* 2013).

### 1.3 Kontaminationsproblematik in industriellen Mikroalgenanlagen

Biologische Kontaminationen mit Weidetierchen, Algenpathogenen oder -parasiten stellen eine Hauptproblematik in der kommerziellen Algenkultivierung dar. Besonders in offenen Produktionssystemen, welche einem starken Einfluss der Umwelt ausgesetzt sind, können Zusammenbrüche der Mikroalgenpopulation aufgrund einer Infektion mit Schadorganismen zu einem Verlust von bis zu 30 % der jährlichen Produktion führen (McBride *et al.* 2014). Komplexere, geschlossene Photobioreaktoren, wie sie in Deutschland und Europa hauptsächlich genutzt werden, sind weniger anfällig für Infektionen, aber deutlich schwieriger zu dekontaminieren, wenn Schadorganismen eingeschleppt wurden (Carney und Lane 2014; Fisher und Lane 2019). Außerdem werden in der industriellen Kultivierung vor allem spezifisch ausgewählte Algenstämme eingesetzt, die besonders hohe Wachstumsraten aufweisen oder spezifische bioaktive Inhaltsstoffe akkumulieren. Um den Ertrag der Biomasse und/oder Inhaltsstoffe möglichst hochzuhalten werden dafür vornehmlich Algen-Monokulturen eingesetzt. Wie aus der klassischen Agrarwirtschaft bekannt, zeichnen sich Wachstumseinbrüche, die von spezifischen Pathogenen hervorgerufen werden, in Monokulturen besonders ab, da sich die Infektion in Populationen mit sehr niedriger Diversität ungehindert verbreiten kann (He *et al.* 2016; Zhan *et al.* 2015). Ähnliche Effekte wurden ebenfalls für Mikroalgen-Kulturen berichtet (Shurin *et al.* 2013).

Wachstumseinbrüche durch biologische Kontamination können von einer großen Bandbreite eingeschleppter Organismen hervorgerufen werden (Abbildung 1) (Fisher und Lane 2019; Wang *et al.* 2013).



**Abbildung 1: Biologische Kontaminanten in Mikroalgenkulturen (nach Fisher and Lane 2019)**

Ein schleichender Produktionsverlust tritt auf, wenn andere Mikroalgenarten spezifische Monokulturen kontaminieren und mit der Ziel-Spezies um Nährstoff-Ressourcen konkurrieren (Wang *et al.* 2013). Obwohl hier ein weiterer Zuwachs der Biomasse stattfinden kann, gibt es

Einbußen bei der Zusammensetzung der Biomasse und den erwünschten Produkten. Einige Bakterienarten können einen hemmenden Einfluss auf das Wachstum der Algen ausüben oder die Population durch Lyse zerstören, wenn sie axenische Kulturen infizieren (Lee *et al.* 2018). Eine weitere Problematik stellt der stetige Verlust von Biomasse durch Abweiden (Grazing) durch klassische räuberische Zooplanktonspezies wie Ciliaten, Rotiferen oder Copepoden dar (Frederiksen *et al.* 2006; Rosetta und McManus 2003). Virusinfektionen können ebenfalls nachhaltige Veränderungen der Struktur, Diversität und Sukzession in Algenpopulationen hervorrufen können (Evans und Wilson 2008). Eine weitere oft vernachlässigte, aber häufig auftretende Problematik, wird durch das Auftreten von parasitären Wasserpilzen hervorgerufen (Kagami *et al.* 2007; Letcher *et al.* 2013).

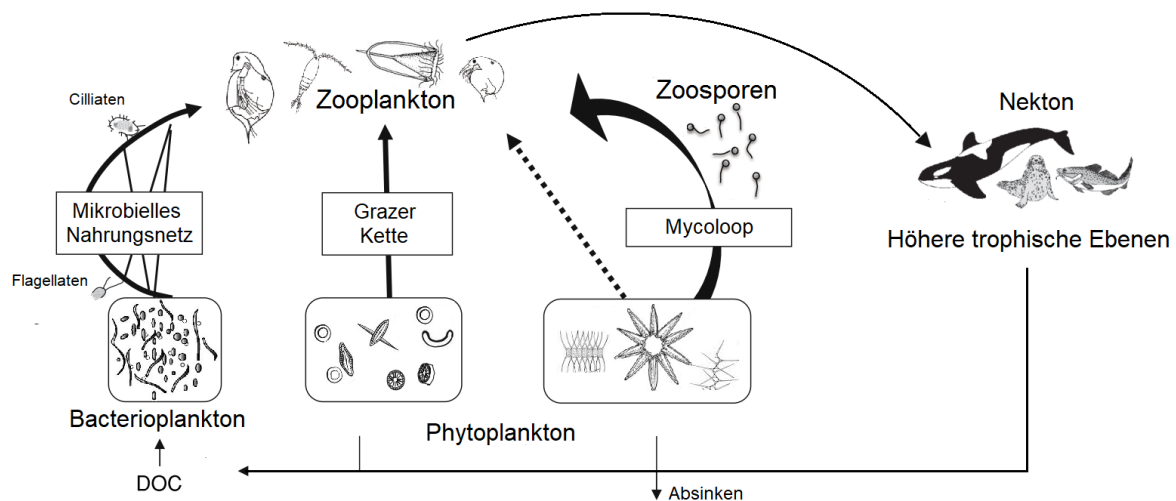
### 1.3.1 Parasitische Wasserpilze

Parasitismus ist eine weitverbreitete zwischenartliche Interaktion, die eine signifikante Rolle für die Stabilität von Ökosystemen und die Evolution spielt. Die Pathogenität eines Parasiten beschreibt die potenzielle Fähigkeit, Krankheiten zu erzeugen, während die Virulenz die schädigende Wirkung der Krankheit abbildet, also den Grad der Pathogenität innerhalb einer Population oder Art misst (Shapiro-Ilan *et al.* 2005).

Zoosporenbildende parasitische Wasserpilze kommen weltweit vor und können durch Epidemien entscheidende Veränderungen in aquatischen Nahrungsnetzen bewirken, deren Effekte heute noch nicht umfassend verstanden wurden (Gachon *et al.* 2010; Gleason *et al.* 2011). Generell ist davon auszugehen, dass die Diversität und Auswirkung solcher Algenpathogene in der Vergangenheit deutlich unterschätzt wurden, da zoosporenbildende Parasiten einen großen Teil der unzureichend charakterisierten genetischen Vielfalt in aquatischen Systemen repräsentieren. Molekulare Studien weisen darauf hin, dass nicht kultivierte Stämme deutlich häufiger in Umweltproben vorkommen, als die wenigen beschriebenen Arten (Karpov *et al.* 2013; Lazarus und James 2015). In vielen aquatischen Lebensräumen folgt der Befall von zoosporenbildenden Parasiten laut Jephcott *et al.* (2017) der natürlichen Fluktuation von Planktonblüten: Mit zunehmender Biomasse einer Phytoplanktonblüte, vermehren sich z. B. Chytridien und Aphelidien und befallen die Wirtsalgen mit rasch steigender Infektionsrate. Der Verlust durch Abweiden, Parasitismus und sich ändernde Wachstumsbedingungen resultiert letztendlich im Zusammenbruch der Algenpopulation. Verzögert zum Rückgang der Algen, kommt es ebenfalls zu einer Abnahme der Parasitenpopulation. Wirt und Parasit bilden häufig Überdauerungsformen aus bis die nächste Blüte beginnt und sich der Zyklus wiederholt. Untersuchungen weisen darauf hin, dass eine solche zeitliche Fluktuation einen auf Dauer stabilisierenden Einfluss auf die

Ökosystemeigenschaften ausübt (Frenken *et al.* 2017; Grami *et al.* 2011; Jephcott *et al.* 2017; Rasconi *et al.* 2014).

In derart regulierten Ökosystemen spielen zoosporenbildende Parasiten für die Biodiversität und Sukzession eine entscheidende Rolle, indem sie Populationsgrößen regulieren und Nährstoffe für höhere trophische Ebenen zugänglich zu machen (Frenken *et al.* 2017; Jephcott *et al.* 2017; Kagami *et al.* 2014; Rasconi *et al.* 2014; Sime-Ngando 2012; van Donk 1989). Der als ‚Mycoloop‘ bezeichnete Nährstoffkreislauf stellt ein relativ neues ökologische Konzept dar, das die Bedeutung von Zoosporen bei der Rückführung von Nährstoffen ins Nahrungsnetz beschreibt (Abbildung 2) (Kagami *et al.* 2014). Während viele Mikroalgenarten einen gewissen Fraßschutz gegen Zooplankton aufweisen, stellen die meisten Zoosporen aufgrund ihrer Größe, Form, Nährstoffzusammensetzung und hohen Dichte während eines Befalls eine optimale Beute dar. Außerdem führt die Fragmentierung der Algenzellen durch den Parasitenbefall dazu, dass Zellfragmente von Algen, die sich sonst dafür nicht eignen, direkt vom Zooplankton aufgenommen werden können. In einer parasitierten Algenblüte werden die Nährstoffe, die in Algen gebunden sind dementsprechend via zoosporenbildender Parasiten auf das Zooplankton übertragen und für höhere trophische Ebenen im Nahrungsnetz verfügbar (Kagami *et al.* 2014).



**Abbildung 2: Integration des ‚Mycoloops‘ in die die Verknüpfungen im natürlichen aquatischen Nahrungsnetz (nach Kagami *et al.* 2007)**

Indem zoosporenbildende Parasiten große, für den Fraß durch Zooplankton ungeeignete Algen infizieren, werden sowohl die absterbende fragmentierte Biomasse der Algen sowie die Zoosporen selbst für höhere trophische Ebenen in Nahrungsnetz verfügbar. DOC = gelöster organischer Kohlenstoff

Während die Bedeutung von zoosporenbildenden Parasiten im Nahrungsnetz einen relativ neuen Paradigmenwechsel in der aquatischen Ökologie darstellt, stehen deren bekannteste

Vertreter, die Chytridien, schon seit Anfang des 20. Jahrhunderts im Fokus der Phykologie (Atkinson 1909). Im Gegensatz dazu dauerte es länger bis wissenschaftliches Interesse an der Erforschung selteneren Gruppen wie Aphelidien entstand (Gromov 2000; Schnepf *et al.* 1971). Aphelidien stellen eine kaum erforschte Gruppe intrazellulärer Parasitoiden dar, die vor allem durch die ungeklärte phylogenetische Einordnung Interesse erweckten. Genauso wie Chytridiomycota und viele andere zoosporenbildende Parasiten gehören Aphelidien der großen eukaryotischen Gruppe der Ophisthokonten an (Jephcott *et al.* 2017). Innerhalb dieses Taxons wurde das Phylum der Aphelidiomycota als Schwestertaxon zu Cryptomycota und Microsporidia eingeordnet und zusammen mit diesen beiden Phyla zum Supercluster Opisthospordia zusammengefasst (Karpov *et al.* 2014a). Es wird vermutet, dass diese Abstammungslinie sich vor etwa 710 bis 1060 Millionen Jahre von der Hauptlinie der Pilze abgespalten hat (Lücking *et al.* 2009). Damit bilden Opisthospordia ein getrenntes Schwestertaxon zu den echten Pilzen, welche wiederum *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota* und *Chytridiomycota* sensu lato umfassen. Neuste Erkenntnisse deuten darauf hin, dass sich Pilze aus aphelidien-ähnlichen Vorfahren entwickelten, die die Phagotrophie verloren und zur Osmotrophie übergingen (Torruella *et al.* 2018).

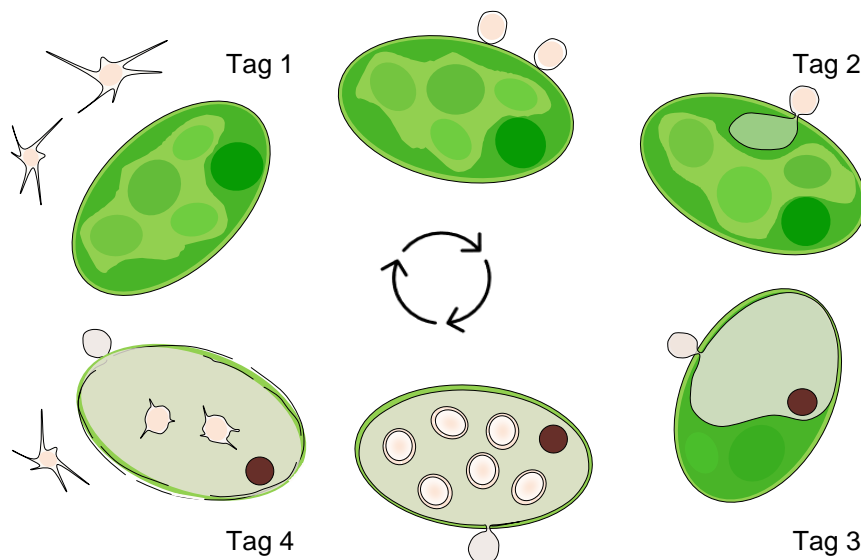
Trotz der hohen Diversität, die in den letzten Jahren von molekularen Umweltstudien enthüllt wurde, als auch der besonderen phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse wurden bisher in der einzigen Familie der Aphelidiaceae nur vier Gattungen (*Aphelidium*, *Amoebophilidium*, *Pseudaphelidium*, und *Paraphelidium*) mit insgesamt 18 Arten und nur wenigen molekular untersuchten Stämmen im Detail beschrieben (Tabelle 2) (Karpov *et al.* 2017; Letcher und Powell 2019).

**Tabelle 2: Übersicht über beschriebene Arten aus der Gruppe der Aphelidien**

Parasit		Wirt		Beschreibung
Gattung	Spezies	Spezies	Phylum	Autor (Jahr)
<i>Aphelidium</i>	<i>chaetophorae</i>	<i>Chaetophora elegans</i>	Chlorophyta	Scherffel (1925)
	<i>deformans</i>	<i>Coleochaete sp.</i>	Chlorophyta	Zopf (1885)
	<i>desmodesmi</i>	<i>Desmodesmus armatus</i>	Chlorophyta	Letcher (2017)
	<i>melosirae</i>	<i>Melosira varians</i>	Bacillariophyta	Scherffel (1925)
	<i>tribonematis</i>	<i>Tribonema gayanum</i> , <i>Botriodiopsis intercedens</i>	Xanthophyta	Scherffel (1925)
	<i>chlorococcorum</i>	<i>Scenedesmus armatus</i> , <i>Chlorococcales</i>	Chlorophyta	Fott (1957)
	<i>chlorococcarum f. majus</i>	<i>Chlorococcales</i>	Chlorophyta	Gromov & Mamkaeva (1970)
	<i>ardennuense</i>	<i>Tribonema gayanum</i>	Ochrophyta	Tcvetkova (2019)
	<i>collabens</i>	<i>Coccomyxa sp.</i>	Chlorophyta	Seto (2020)
	<i>insulamus</i>	<i>Tribonema gayanum</i>	Ochrophyta	Karpov (2020)

<i>Amoebophilidium</i>	<i>achnanthis</i>	<i>Achnanthes lanceolata</i>	Bacillariophyta	Scherffel (1925)
	<i>protococcarum</i>	<i>Scenedesmus</i> , <i>Protococcus</i> <i>Chlorococcorum</i> sp.	Chlorophyta	Gromov & Mamkaeva (1968)
	<i>chlorellavorum</i>	<i>Chlorella</i> sp.	Chlorophyta	Gromov & Mamkaeva (1968)
	<i>radiatum</i>	<i>Kirchneriella</i> sp. <i>Ankistrodesmus</i> sp.	Chlorophyta	Gromov & Mamkaeva (1969)
	<i>occidentale</i>	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	Chlorophyta	Letcher (2015)
<i>Pseudophilidium</i>	<i>drebesii</i>	<i>Thalassiosira punctigera</i> , <i>Diatoma</i>	Bacillariophyta	Schweikert & Schnepf (1996)
<i>Paraphilidium</i>	<i>letcheri</i>	<i>Tribonema gayanum</i>	Ochrophyta	Karpov & Torruella (2017)
	<i>tribonematis</i>	<i>Tribonema gayanum</i>	Ochrophyta	Karpov (2017)

Aphelidien zeichnen sich morphologisch durch einen komplexen Lebenszyklus mit verschiedenen Lebensformen wie Zyste, Trophont, Plasmodium, Sporangium und Spore aus (Abbildung 3). Laut Gromov (2000) stellt vor allem das interzelluläre amöboide Stadium, das Zellbestandteile des Wirts mittels Phagozytose aufnimmt, eine distinkte morphologische Besonderheit der Aphelidien dar. Der Vermehrungszyklus wurde von Letcher und Kollegen im Jahr 2013 für die neu beschriebene Art *Amoebophilidium protococcarum* folgendermaßen dokumentiert (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Lebenszyklus von *A. protococcarum* in *Scenedesmus*-Kulturen (nach Letcher *et al.* 2013)**

Gesunde Algenkulturen werden zunächst von freischwimmenden amöboiden Aplanosporen infiziert, die sich innerhalb des nächsten Tages mit Apressorien an die Zellwand der Algen anheften. Die eingekapselten Sporen durchdringen die Zellwand anschließend mithilfe eines Keimfadens und stoßen so bis ins Cytoplasma der Wirtszelle vor. Über diese Verbindung wird nachfolgend der Protoplast des Aphelidiums in die Algenzelle eingeschleust. Die cytoplasmatischen Zellbestandteile der Algen werden nach und nach als Nährstoffquelle

phagozytiert, um neue Sporen auszubilden. Diese reifen in der Alge heran, wobei die Zellwand als Art Sporangium dient, bis die Wirtszelle aufplatzt und neue Sporen in die Umgebung entlässt. Die toten Algenzellen bleiben als leere Hülle mit einem oder mehreren Lipidglobuli (Residualkörper) als Überbleibsel des Parasiten zurück. Der Zyklus wiederholt sich alle drei bis vier Tage einige Male, bis kaum noch lebende Algenzellen in der Kultur vorhanden sind. In älterer Literatur werden für *A. protococcarum* vor allem *Scenedesmus* und *Protococcus*-Arten als Wirte genannt (Letcher und Powell 2019). Außerdem wurde wiederholt berichtet, dass *A. protococcarum*-Stämme ein hoch spezifisches Wirtsspektrum und unterschiedliche Virulenzen bei verschieben Algenstämmen aufweisen (Ding *et al.* 2017; Gromov und Mamkaeva 1969).

Im Jahr 2018 wurde ein globales Transkriptom von *Paraphelidium tribonemae* erstellt, um den phagotrophen Ursprung von Aphelidien zu bestätigen (Torruella *et al.* 2018). Die Ergebnisse umfassten ein aus den genomischen Daten abgeleitetes ‚potentielles Proteom‘, das den gesamten Lebenszyklus abdeckt und auf einen für Pilze typischen Stoffwechsel hindeutet. Dabei wurden beispielsweise Cellulasen, welche an der Durchdringung der Algenzellwand beteiligt sind, und Enzyme, die an der Chitinbiosynthese beteiligt sind, gefunden. Im Rahmen der erst kürzlich durchgeführten Untersuchungen von Ding und Kollegen (2021) zur Infektion der Grünalge *Graesiella emersonii* mit *A. protococcarum*, wurde festgestellt, dass Gene für Pathogen-Wirt-Interaktionen und Effektoren während der Infektion signifikant hochreguliert wurden und so für eine robuste Pathogenität sorgen. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass der Vakuolentransport, die Endozytose, das Phagosom, die Ubiquitin-vermittelte Proteolyse und SNARE-Proteinen (engl. Abkürzung für: soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor) eine große Rolle während der Infektion spielen (Ding *et al.* 2021).

Im Biosolarzentrum der Hochschule Anhalt trat im Jahr 2013 ein bis dato unbekanntes parasitisches Algenpathogen (AI15TR) auf, das das Wachstum der Algenkulturen in den Tannenbaumreaktoren deutlich eingeschränkt hat (Matthes 2020). Der Organismus konnte anhand erster mikroskopischer Beobachtungen der Gruppe der Aphelidien zugerechnet werden und es wurde ein unterschiedlich starker Befall bei verschiedenen Grünalgen festgestellt. Die genaue Bestimmung des Apheliden-Stammes AI15TR sowie die Untersuchung von Pathogenitäts- und Virulenzmustern werden in dieser Arbeit untersucht.

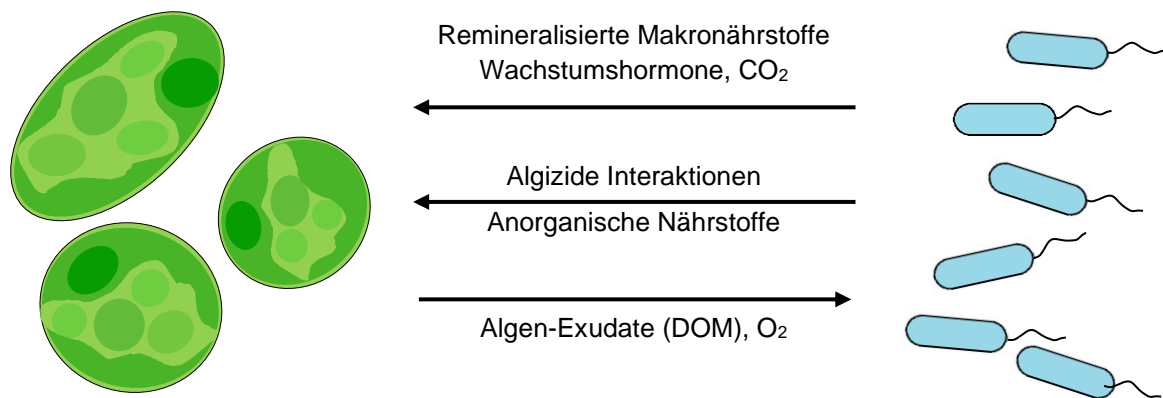
### 1.3.2 Bakterielle Gemeinschaft

Lange Zeit wurde jeder weitere Organismus abgesehen von der Algenspezies als bloße Kontamination in Algenkulturen angesehen. In den letzten Jahren hat sich diese Ansicht geändert, da mittlerweile viele synergetische Effekte zwischen Algen und weiteren Mikroorganismen bekannt sind (Lian *et al.* 2018; Ramanan *et al.* 2016). Da Mikroalgen seit jeher mit vielen weiteren Organismen im gleichen Lebensraum existieren, sollte für eine erfolgreiche Kultivierung der Aspekt interspezifischer Wechselwirkungen nicht außen vorgelassen werden.

Mikroalgen sind in natürlichen Ökosystemen eng mit komplexen mikrobiellen Gemeinschaften vergesellschaftet und durch eine seit Jahrmillionen andauernde Co-Evolution haben sich stark verknüpfte Interaktionsmuster ausgebildet (Ramanan *et al.* 2016). Die Beziehung von Phytoplanton und Bakterien ist entscheidend für die Stabilität von aquatischen Ökosystemen und hat einen maßgeblichen Einfluss auf biochemische Zyklen auf globaler Ebene (Azam 1998; Buchan *et al.* 2014). In limnischen Habitaten werden vornehmlich die bakteriellen Phyla  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -Proteobacteria, Bacteroidetes, Planctomycetes, Actinobacteria und Verrucomicrobia beobachtet (Bižić-Ionescu *et al.* 2015). Die Phycosphäre – die Mikroumgebung um und auf der Oberfläche von Algen – bietet durch den Austausch von verschiedensten Metaboliten und chemischen Verbindungen einen attraktiven Lebensraum für viele Mikroorganismen (Seymour *et al.* 2017). Diese Interaktionen resultieren in einem breiten Spektrum von interspezifischen Wechselbeziehungen, das Symbiose, Mutualismus, Kommensalismus, Konkurrenz, Parasitismus, Episitismus und verschiedene Mischformen bzw. Übergänge umfasst (Cirri und Pohnert 2019; Kazamia *et al.* 2016; Ramanan *et al.* 2016; Seymour *et al.* 2017). Organismen, die mit unterschiedlichen oder sich ändernden Umweltbedingungen gut zurechtkommen, werden als Opportunisten oder auch Generalisten bezeichnet (Diller *et al.* 2019). Opportunistische Pathogene verursachen beispielsweise nur bei immungeschwächten oder gestressten Wirten Krankheiten (Burge *et al.* 2013).

Algen sind auf die bakterielle Zersetzung und Remineralisierung von organischer Materie zu anorganischen Substanzen angewiesen, die wiederum das Wachstum von Algen fördern (Abbildung 4). Im Gegenzug benötigen die bakteriellen Partner organischen Kohlenstoff, z.B. aus photosynthetischen Assimilaten für ihr Wachstum (Azam und Malfatti 2007; Worden *et al.* 2015). Darüber hinaus wurden weitere komplexe Interaktionen beobachtet, die den Austausch einer Vielzahl von Mikronährstoffen, Co-Faktoren, Siderophoren, Antibiotika und Phytohormonen umfassen (Amin *et al.* 2015; Bruhn *et al.* 2007; Croft *et al.* 2005; Danchin und Braham 2017; de-Bashan und Bashan 2008; Rolland *et al.* 2016).



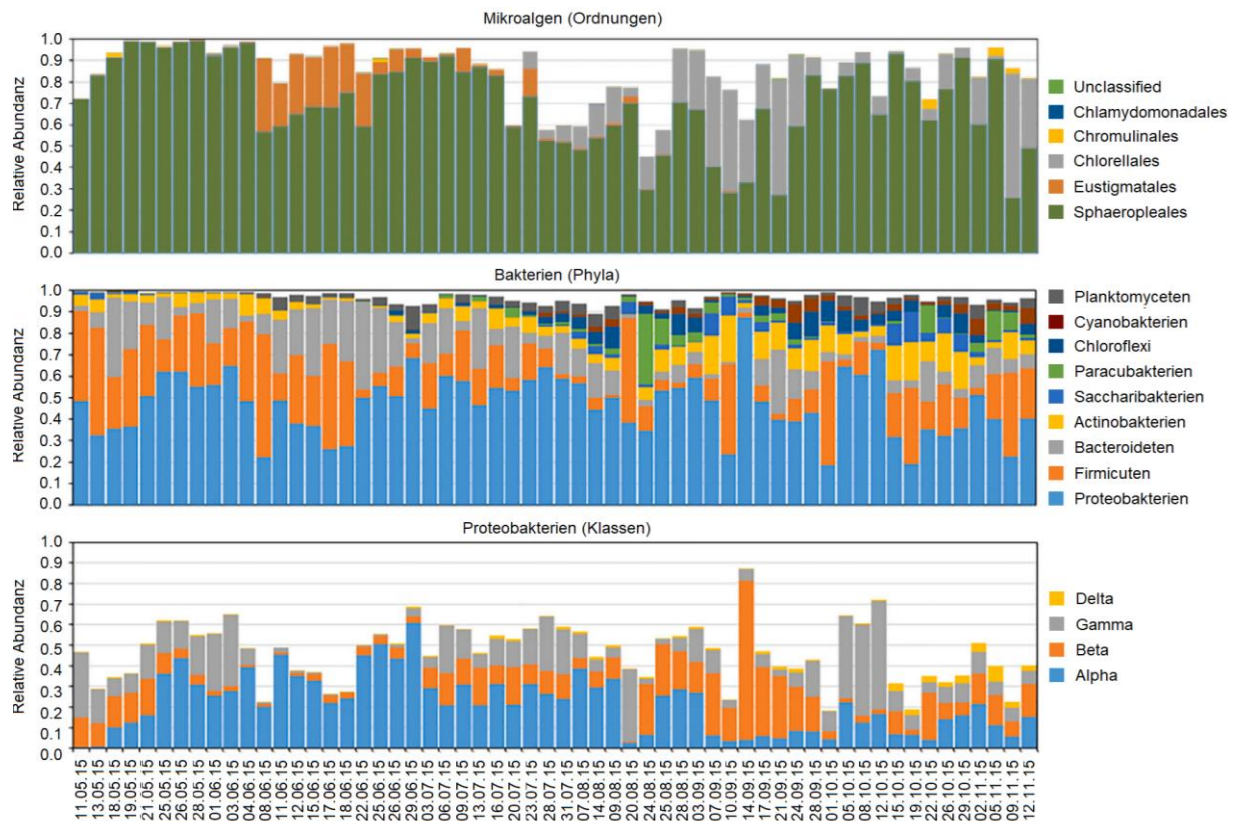


**Abbildung 4: Beispielhafte Interaktionen von Mikroalgen und Bakterien (nach Lian *et al.*, 2018)**

Diese Metaboliten werden unter anderem mit Wachstumsförderung, Sporenkeimung, Morphogenese und Resistenz gegenüber Krankheiten in Verbindung gebracht (Lian *et al.* 2018; Ramanan *et al.* 2016). Das bekannteste Beispiel einer mutualistischen Beziehung zwischen Bakterien und Algen ist die Bereitstellung von Vitamin B12 im Austausch gegen fixierte Kohlenstoffprodukte (Croft *et al.* 2005; Kazamia *et al.* 2012b). Ein weiteres Beispiel stellen Plant-Growth-Promoting-Bacteria (PGPB) dar, die klassischerweise aus der Rhizosphäre von Landpflanzen bekannt sind und das Pflanzenwachstum positiv beeinflussen. Für *Chorella sorokiniana* konnte eine deutliche Wachstumssteigerung durch die Zugabe von volatilen Stoffen von *Azospirillum brasilense* und *Bacillus pumilus*, auch ohne direkten physischen Kontakt erreicht werden (de-Bashan und Bashan 2008). Zusätzlich zur Wachstumssteigerung konnte eine Steigerung von Lipid-, Kohlenhydrat- und Chlorophyll *a*-Gehalt induziert werden, was auf eine Änderung in der Physiologie schließen lässt (Amavizca *et al.* 2017; de-Bashan *et al.* 2002). Ähnliche Ergebnisse wurden in den letzten Jahren für weitere Assoziation von Bakterien und Mikroalgen entdeckt (Cao *et al.* 2019; Le Chevanton *et al.* 2013; Park *et al.* 2008; Tanabe *et al.* 2015; Toyama *et al.* 2018). Andererseits wurden für einige algenassoziierte Bakteriengruppen auch negative Effekte auf das Algenwachstum berichtet. Dabei können sowohl indirekte Effekte wie Nährstoffkonkurrenz als auch direkte Mechanismen, bei denen die Algenzellen inaktiviert oder lysiert werden eine Rolle spielen (Bratbak und Thingstad 1985; Fulbright *et al.* 2016; Paul und Pohnert 2011; Seyedsayamdost *et al.* 2014; Wang *et al.* 2012). Negative Effekte von eingeschleppten Organismen in Algenkulturen werden häufig auf generelle zwischenartliche Konkurrenz oder Parasitismus zurückgeführt. Eine Studie von Fulbright *et al.* (2016) konnte allerdings deutlich zeigen, dass die Ausprägung der Interaktion stark von den beteiligten Spezies abhängt. Dem PGPB *B. pumilus* wurde eine inhibierende Wirkung auf *Nannochloropsis sp.* nachgewiesen. In Co-Kultivierungsversuchen konnte so gezeigt werden, dass die Komposition der Kulturen zu Gunsten von *C. vulgaris* und *T. striata* verschoben wird, da diese Algen im Wachstum gefördert

werden, während *Nannochloropsis sp.* benachteiligt ist (Fulbright *et al.* 2016). Die Interaktion von Bakterien und Algen kann des Weiteren stark von äußeren Umweltfaktoren wie Temperatur oder Lichtverfügbarkeit beeinflusst werden (Mayers *et al.* 2016; Piwosz *et al.* 2020). Die Beziehung von Algen und assoziierten mikrobiellen Gemeinschaften muss demnach als eine dynamische Abfolge von variablen Zuständen eines hochkomplexen Netzwerks, das sich gegenseitig beeinflusst und von variablen Umweltbedingungen reguliert wird, angesehen werden (Cirri und Pohnert 2019; Fuentes *et al.* 2016; Gurung *et al.* 1999; Mayers *et al.* 2016; Seyedsayamdost *et al.* 2014).

Das Verständnis der bakteriellen Zusammensetzung und Interaktionsmustern in der Phycosphäre, sowie die Treiber dieser Prozesse sind immer noch lückenhaft, obwohl jüngste Veröffentlichungen die Bedeutung von mikrobiellen Interaktionen in Algengemeinschaften hervorheben (Seymour *et al.* 2017). Einige Studien berichten von spezies-spezifischen Interaktionen zwischen Mikroalgen und Bakterien (Behringer *et al.* 2018; Crenn *et al.* 2018; Koedooder *et al.* 2019; Krohn-Molt *et al.* 2017; Mönnich *et al.* 2020), während andere Untersuchungen festgestellt haben, dass die Interaktionsmuster hauptsächlich auf funktionellen Eigenschaften der Bakterien beruhen (Geng *et al.* 2016b; Ramanan *et al.* 2015). Eine detaillierte Untersuchung der phylogenetischen Zusammensetzung und Struktur von algenassoziierten Mikrobiomen ist in industriellen Algenanlagen im Vergleich zu natürlich Systemen noch wenig untersucht. Bakterielle Mikrobiome in nicht axenischen Mikroalgenkulturen in Laboren und industriellen Anlagen werden hauptsächlich von aquatischen  $\alpha$ -,  $\beta$ , und  $\gamma$ -Proteobacteria, sowie Actinobacteria and Bacteroidetes dominiert (Biondi *et al.* 2017; Ferro *et al.* 2020; Krohn-Molt *et al.* 2013; Lakaniemi *et al.* 2012; Ramanan *et al.* 2015). Wenige deskriptive Studien untersuchen, inwiefern mikrobielle Gemeinschaften in kommerziell genutzten Bioreaktoren Auswirkungen auf die Mikroalgenproduktion haben. Mittels Amplicon-Sequenzierung haben Geng und Kollegen (2016) Open Ponds über einen Zeitraum von einem Monat hinsichtlich ihrer mikrobiellen Gemeinschaft analysiert. Sie konnten zum einen zeigen, dass die Wachstumsphase von *N. salina* mit einer Änderung der Zusammensetzung des Mikrobioms einhergeht, die mikrobielle Gemeinschaft in den offenen Kulturen zudem hoch divers ist und dynamisch auf Umweltänderungen reagiert (Geng *et al.* 2016a). In einer Studie von Ferro *et al.* (2020) wurde die mikrobielle Gemeinschaft in einem offenen Photobioreaktor zur kommunalen Abwasserbehandlung auf Mikroalgenbasis über einen Zeitraum von sechs Monaten mittels DNA-Metabarcoding untersucht. Der Reaktor mit *Scenedesmus dimorphus* Kulturen wurde im Semi-Batch-Modus mit weiteren Mikroalgenarten und Zooplankton kontaminiert. Änderungen der Zusammensetzung der dominanten Bakteriengruppen - Proteobakterien, Firmicutes, Bacteroidetes und Actinobacteria – waren jeweils positiv oder negativ mit dem Wachstum von *Scenedesmus* korreliert (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Veränderungen der Zusammensetzung der Mikroalgengemeinschaft in einem offenen Photobioreaktor im Pilotmaßstab über sechs Monate (nach Ferro et al. 2020)**

Über einen Zusammenhang mit der Biomasseproduktivität hinaus, wird das Potential von bakteriellen Mikrobiomen als vielversprechend für verschiedene biotechnologische Anwendungen wie vereinfachte Ernteprozesse (Flokkulation), Abwasserbehandlung und Bioremediation in der Aquakultur angesehen (Fuentes *et al.* 2016; Wang *et al.* 2014).

Zusammenfassend könnten Wissen und Kontrolle über Mechanismen der Interaktion von Mikroorganismen und Algen eine entscheidende Rolle spielen, um die Produktionsprozesse für Mikroalgenkultivierung in der Biotechnologie deutlich zu verbessern.

#### 1.4 Molekularbiologische Analytik von Mikroalgengemeinschaften

Molekulare Untersuchungen haben in den letzten zwei Jahrzehnten zunehmend die Diversität von algenassoziierten Mikrobiomen und die Komplexität der Interaktionen in künstlichen Mikroalgengemeinschaften, die denen in natürlichen Ökosystemen gleichen, aufgedeckt (Ferro *et al.* 2020; Lian *et al.* 2018).

Die Basis bilden klassische qualitative Methoden, die zur Erstellung eines molekularen Fingerabdrucks eingesetzt werden, der erste Einblicke in die taxonomische Zusammensetzung einer mikrobiellen Gemeinschaft erlaubt. Dazu gehören beispielsweise die denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (Muyzer *et al.* 1993) oder die Analyse des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (Clement *et al.* 1998; Liu *et al.* 1997). Zum Nachweis bekannter Mikroorganismen eignet sich sowohl die Sangersequenzierung isolierter Spezies mittels spezifischer Markergene (Sanger *et al.* 1977), sowie die Fluoreszenz-InSitu-Hybridisierung anhand spezifischer Sonden (Bauman *et al.* 1980; Rudkin und Stollar 1977). Auch eine quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) kann anhand von spezifischen Primern quantitative Aussagen über die Zusammensetzung bestimmter bekannter Taxa oder Spezies einer Gemeinschaft geben (Brunk *et al.* 2002; Jian *et al.* 2020).

Die wachsende Erkenntnis zur quantitativen Struktur und Funktion von mikrobiellen Gemeinschaften wird in den letzten Jahren vor allem von der schnellen technologischen Weiterentwicklung von kultivierungsunabhängigen Hochdurchsatz-Omics-Methoden vorangetrieben. Die ‚Omics‘-Verfahren stellen umfassende Werkzeuge für hochauflösende Analysen von Zellbestandteilen wie Desoxyribonukleinsäure (DNA), Ribonukleinsäure (RNA), Proteine und Metaboliten dar und helfen so das Verständnis von mikrobiellen Interaktionen im Kontext ihrer Umwelt besser zu verstehen. Innerhalb der Zelle wird DNA zunächst zu Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) transkribiert und dann zu Proteinen translatiert, die wiederum zu verschiedenen Metaboliten verstoffwechselt werden können. Die Metagenomik umfasst die Analyse der DNA eines Mikrobioms und kann so quantitativen Überblick über die Taxonomie mikrobieller Gemeinschaften bieten, während die Transkriptomik die funktionelle Zusammensetzung der mRNA untersucht und Informationen zu Genexpression und -regulation bietet. Analog dazu befassen sich Proteomik und Metabolomik mit dem Pool der vorhandenen Proteine und Stoffwechselprodukte und bieten Einblick in den Zellmetabolismus (Mishra *et al.* 2019). Je nach wissenschaftlicher Thematik kommen einzelne Omics-Ansätze zum Einsatz. Eine Kombination verschiedener Technologien ist ebenfalls möglich, um einen möglichst vielschichtigen Einblick in die Zusammensetzung und Funktionsweise von unbekanntem Mikrobiomen zu erlangen (Argelaguet *et al.* 2018; Beaulieu 2019).

#### 1.4.1 Amplicon-Sequenzierung zur Entschlüsselung der mikrobiellen Diversität

Sequenzbasierte genomische Ansätze erfordern eine DNA-Extraktion, Amplifikation, Sequenzierung und Downstream Datenanalyse, die eine phylogenetische Zuordnung der Sequenzen der Mischgemeinschaft erlaubt. Ein Teilgebiet stellt die Untersuchung von Markergenen mittels Next-Generation-Sequenzierung (NGS) wie Amplicon-Sequenzierung (z.B. Illumina) dar. Als Markergen für Prokaryoten wurde dazu das 16S ribosomale Ribonukleinsäure (rRNA)-Gen etabliert, da sowohl variable als auch konservierte DNA-Bereiche in diesem Sequenzabschnitt enthalten sind (Amann *et al.* 1995; Janda und Abbott 2007). Im Anschluss können die Sequenzen über einen Datenbankenabgleich z.B. mit dem Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) taxonomisch zugeordnet werden. Die Sequenzen werden bei der Prozessierung anhand ihrer Übereinstimmung (z.B. 97-99 %) zu Operational Taxonomic Units (OTUs) zusammengefasst, die häufig als molekulares Äquivalent zum Speziesbegriff angesehen werden (Edgar 2018b). Aus der taxonomischen Zusammensetzung lassen sich durch spezielle Algorithmen, wie beispielsweise PICRUSt (Langille *et al.* 2013) oder Datenbanken wie FAPROTAX (Louca *et al.* 2016; Sansupa *et al.* 2021), außerdem Informationen über das funktionelle Potential aus Sequenzdaten abgeleitet werden. Darüber hinaus kommen funktionelle, metagenomische Ansätze zum Einsatz, die das biochemische und metabolische Potential kodierender Gene erfassen, indem Gensequenzen der Gemeinschafts-DNA durch homologe Übereinstimmungen mit bekannten Sequenzen annotiert werden. Die technische Weiterentwicklung der Sequenzierungs-technologien bezüglich Durchsatzes oder Readlängen, sowie die sinkenden Kosten und bessere Verfügbarkeit resultieren in einer rasch ansteigenden Menge an Sequenzdaten.

Auf dem Gebiet der Algenbiotechnologie wurden erst im letzten Jahrzehnt umfangreiche Datensätze zur Zusammensetzung von artifiziellen Algenpopulationen veröffentlicht (Behringer *et al.* 2018; Biondi *et al.* 2017; Calhoun *et al.* 2021; Carney *et al.* 2014; Ferro *et al.* 2020; Fulbright *et al.* 2016; Geng *et al.* 2016b; Koedooder *et al.* 2019; Krohn-Molt *et al.* 2013; Lakaniemi *et al.* 2012; Pivosz *et al.* 2020; Ramanan *et al.* 2015; Seymour *et al.* 2017). Im Jahr 2018 wurden beispielsweise die Veränderungen der bakteriellen Gemeinschaft in einem industriellen System zur Algenproduktion von Fulbright und Kollegen beschrieben. Amplicon-Sequenzierung wurde ebenfalls zur Beobachtung der Dynamik der mikrobiellen Gemeinschaft in offenen Abwasser-Photobioreaktoren eingesetzt (Ferro *et al.* 2020). Außerdem wurden Sequenzdaten dazu genutzt, um Assemblierungs-Prozesse des bakteriellen Mikrobioms der Phycosphäre auf Mikroalgen zu beleuchten (Kimbrel *et al.* 2019). Um Interaktionen von Mikroalgen mit assoziierten Bakterien zu analysieren werden Multi-Omics Methoden, die metagenomische, transkriptomische und/oder metaproteomische Datensätze vereinen, eingesetzt (Calhoun *et al.* 2021; Krohn-Molt *et al.* 2017).

#### 1.4.2 Metaproteomik zur Untersuchung von Mikroalpengemeinschaften

Die Metaproteomik beschäftigt sich mit der Analyse aller Proteinkomponenten, die zu einem bestimmten Zeitpunkt in einer mikrobiellen Gemeinschaft vorhanden sind. Diese Methode erfordert dabei keine Isolierung einzelner Arten und wurde erstmals 2004 von Wilmes und Bond sowie von Rodriguez-Valera vorgestellt (Rodriguez-Valera 2004; Wilmes und Bond 2004, 2006). Im Gegensatz zu einem Metatranskriptom ermöglichen proteomische Analysen einen direkten Einblick in Proteinprofile und somit eine detaillierte Einschätzung der tatsächlichen funktionellen Aktivität verschiedener Mikroorganismen. Dafür wird das komplexe Gemisch von Proteinen aus Umweltproben extrahiert und typischerweise mit einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie aufgetrennt und anschließend mittels Massenspektrometrie (z.B. nanoLC-MS/MS) gemessen. Die taxonomische Zuordnung der identifizierten Proteine erfolgt durch einen Abgleich mit Metagenom- und Proteindatenbanken wie uniProt oder swissProt. Datenbanken für Stoffwechselfunktionen wie die Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (Kanehisa *et al.* 2017; Kanehisa und Goto 2000) ermöglichen außerdem die Verknüpfung der taxonomischen Informationen mit definierten Funktionen.

Die frühe Proteomforschung an Algen konzentrierte sich hauptsächlich auf die wichtigsten Stoffwechselprozesse des Modellorganismus *Chlamydomonas reinhardtii* (Hippler *et al.* 2001; Rolland *et al.* 2009). In jüngster Zeit rückte vor allem die Stressreaktion der Algen auf Nährstoffbeschränkungen, Lichtbedingungen oder extreme Temperaturregime in den Fokus (Anand *et al.* 2017; Ben Amor *et al.* 2017; Büchel *et al.* 2017; Feng *et al.* 2015; Fernández-Acero *et al.* 2019; Guarnieri *et al.* 2013; Hulatt *et al.* 2020; Longworth *et al.* 2016; Salama *et al.* 2019; Shang *et al.* 2017; Thangaraj *et al.* 2019; Thangaraj *et al.* 2020; Vello *et al.* 2018). Im Gegensatz dazu sind die Effekte von interspezifischen Interaktionen auf Proteinebene kaum untersucht. Eine der am besten beschriebenen positiven Interaktionen von Bakterien und Mikroalgen ist der Austausch von Vitamin B12 gegen fixierte Kohlenstoff-Komponenten (Croft *et al.* 2005), welcher 2018 mithilfe quantitativer Proteomik weiter entschlüsselt werden konnte (Helliwell *et al.* 2018). Die Bedeutung von Allelopathien, also intra- oder interspezifische Wechselwirkungen von freigesetzten chemischen Substanzen, konnten in natürlichen Phytoplankton-Populationen durch metabolische und proteomische Untersuchungen an konkurrierenden Mikroalgenarten in Phytoplanktonblüten aufgezeigt werden (Poulson-Ellestada *et al.* 2014; Song *et al.* 2017). Die Untersuchung von parasitischen Interaktionen auf Proteinebene könnte zum Verständnis beitragen, wie sich infektiöse Abläufe und Abwehrstrategien gegen Pathogene in Mikroalgen manifestieren, um Infektionen von industriellen Algenanlagen zu vermeiden. Ähnlich wie Pflanzen verteidigen sich Algen gegen pathogene Angriffe mit einem breiten Spektrum an konstitutiven und induzierbaren

Abwehrmechanismen (Egan *et al.* 2014; Im *et al.* 2019; Nylund *et al.* 2011; Tang *et al.* 2019; van Donk *et al.* 2011). So berichteten Studien über die Beteiligung von Hitzeschockproteinen, Serinproteasen, ribosomalen Proteinen, des RNA-Stoffwechsels und antioxidativem Stoffwechsels als Reaktion auf drei Pathogene der Rotalge *Pyropia tenera* (Tang *et al.* 2019). Außerdem konnte gezeigt werden, dass reaktive Sauerstoffspezies und der Halogen-Stoffwechsel der Braunalge *Ectocarpus siliculosus* als Abwehrmechanismus gegen die Infektion mit *Eurychasma dicksonii* eingesetzt werden (Strittmatter *et al.* 2016). Des Weiteren wurde berichtet, dass die Rotalge *Pyropia yezoensis* einer Pathogeninfektion gegen den nekrotrophen Erreger *Pythium porphyrae* widersteht, indem die Photosynthese, Energie- und Kohlenhydrat-stoffwechselwege gehemmt werden (Khan *et al.* 2018). Die Abwehrreaktionen auf die Infektion von *A. protococcarum* bei der grünen Mikroalge *Graesiella emersonii* wurden erst kürzlich von Ding *et al.* (2021) untersucht. Sie umfasste Mustererkennungsrezeptoren, große Hitzeschockproteine und reaktive sauerstoff-abfangende Enzyme.

#### 1.4.3 Berechnung mikrobieller Netzwerke auf Basis von Omics-Datensätzen

Sowohl Amplikondaten und Metaproteomdaten lassen sich für Netzwerkberechnung nutzen, die zur Beschreibung möglicher ökologischer Zusammenhänge zwischen verschiedenen Spezies einer Gemeinschaft genutzt werden können. Für Netzwerkanalysen sind sowohl reine Inzidenzdaten sowie Abundanzdaten der verschiedenen Spezies geeignet, die aufgrund der hohen Komplexität von mikrobiellen Gemeinschaften auf statistisch validen Korrelationsberechnungen beruhen (Faust und Raes 2016). Netzwerke sind aus Knotenpunkten (Nodes) und Verbindungen (Edges) aufgebaut, die für Interaktionen zwischen Nodes stehen. Edges vom Typ ‚mutual exclusion‘ stellen negative Wechselwirkungen dar, die beispielsweise auf eine Konkurrenz der beteiligten Arten hinweisen können. Positive Interaktionen werden hingegen von Edges des Typs ‚co-presence‘ angezeigt, die auf Nischenüberlappung oder Abhängigkeiten hinweisen (Faust und Raes 2012). Allen Nodes im Netzwerk können anhand ihrer Verbindungsmuster verschiedenen topologischen Rollen zugewiesen werden (Guimerà *et al.* 2007; Guimerà und Nunes Amaral 2005). Spezialisten haben wenig Interaktionen mit andere Nodes und üben aus diesem Grund nur einen geringen Einfluss auf das eigene Modul und das Gesamtnetzwerk aus. Generalisten sind dagegen innerhalb ihres Modules stark verknüpft oder verbinden mehrere Module miteinander, weshalb sie eine besondere Bedeutung für die Struktur des Netzwerkes aufweisen. Ähnliche Ansätze wurden bisher für mikrobielle Gemeinschaften im Boden (Barberán *et al.* 2012; Zhou *et al.* 2010), dem Ozean (Gilbert *et al.* 2012; Steele *et al.* 2011; Zhao *et al.* 2016), dem Menschen (Arumugam *et al.* 2011; Baldassano und Bassett 2016) oder Biogasanlagen (Buettner *et al.* 2019; Rui *et al.* 2015) angewandt.

## 1.5 Kontaminationsmanagement in industriellen Mikroalgenanlagen

Es gibt eine lange Geschichte der Forschung und Entwicklung für physikalische, chemische und biologische Schutzstrategien für Mikroalgenkulturen und es ist immer noch ein Bereich von aktiver Forschung und Innovation (Fisher und Lane 2019; Wang *et al.* 2013). Es existieren zahlreiche reaktive und präventive Techniken zur Unterdrückung oder Steuerung biologischen Kontaminanten in Mikroalgenkulturen (Abbildung 6). Die meisten genannten Techniken sind allerdings nur zu einer Eindämmung oder Verringerung der Anzahl pathogener Organismen, jedoch nicht zu einer vollständigen Entfernung geeignet (Pleissner *et al.* 2020).

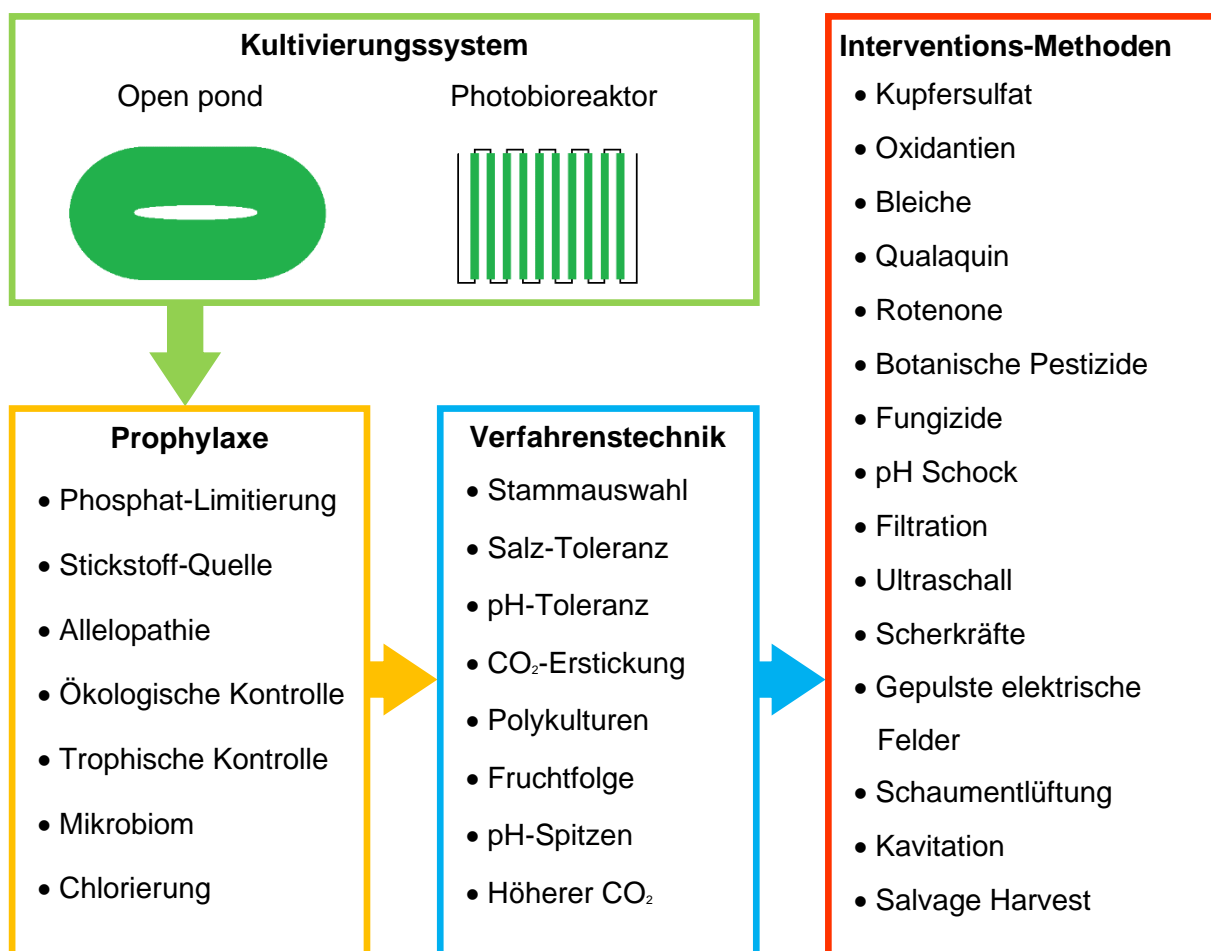


Abbildung 6: Methoden des Kontaminationsmanagements (nach Fisher & Lane 2019)



### 1.5.1 Detektion von biologischen Kontaminanten

Einer der wichtigsten Punkte im Umgang mit durch Kontaminationen hervorgerufenen Wachstumseinbrüchen ist die zugrundeliegende Infektion frühzeitig zu erkennen und zu identifizieren, um reaktive Strategien gezielt einsetzen zu können (Di Caprio 2020).

Die mikroskopische Untersuchung stellt eine unverzichtbare Standard-Methode zur Überwachung von Algenkulturen dar, benötigt jedoch einige Übung bei der Identifikation und ist für viele Kontaminanten ungeeignet. Spezifische fluoreszenzbasierte Färbemethoden erleichtern die Identifikation spezifischer Pathogene. Gerphagnon und Kollegen (2013) haben beispielsweise eine Doppelfärbemethode für Aphelidien vorgeschlagen, die auf der Kombination zweier Fluorochrome besteht: Zusätzlich zu Calcofluor White wird SYTOX Green eingesetzt, um die Zoosporen innerhalb der Algenzellen grün anzufärben zu können (Gerphagnon *et al.* 2013a). Zusätzlich lassen sich gesunde Algenzellen anhand ihrer roten Autofluoreszenz von befallenen Zellen unterscheiden. Rasterelektronenmikroskopie und Transmissionselektronenmikroskopie sind hochauflösende Techniken für morphologische Analyse von Mikroalgen und assoziierten Mikroorganismen (Di Caprio 2020). Beide Techniken sind jedoch teuer, zeitaufwändig und somit für die tägliche Analyse einer großen Anzahl von Zellen oder Kulturen nicht geeignet. Beide Technologien werden allerdings häufig zur morphologischen Charakterisierung der Ultrastruktur von Mikroorganismen oder deren quantitativer Analyse verwendet (de-Bashan *et al.* 2016; Karpov *et al.* 2014b).

Die Durchflusszytometrie ist eine Hochdurchsatztechnik, welche die Analyse einer großen Anzahl von Zellen in kurzer Zeit ermöglicht. Zudem eignet sich diese Methode dazu Proben mit heterogenen mikrobiellen Populationen über ein automatisiertes fluidisch-optisches System zu analysieren. Durchflusszytometrie ermöglicht die Unterscheidung von Mikroorganismen basierend auf ihrer Größe und internen Komplexität, sowie durch Zellautofluoreszenz oder durch spezielle Färbung (Di Caprio 2020). Eine FlowCAM (Fluid Imagig Technologies) vereint flowcytometrische Technik und fluoreszenzmikroskopische Bildgebung und wird zur Charakterisierung und Zählung suspendierter Partikel eingesetzt (Sieracki *et al.* 1998). Mit dieser Technik können verschiedene Mikroalgen unterschieden und parasitierte Zellen halbautomatisch in der Zellkultur erkannt werden (Day *et al.* 2012; Wang *et al.* 2017a).

Als Alternative zu optisch basierten Methoden besteht die Möglichkeit Kontaminanten anhand spezifischer Biomarker mittels molekularer Methoden nachzuweisen. Genetische Analysen stellen die spezifischsten und empfindlichsten Werkzeuge zur Identifizierung von Mikroorganismen dar. Dazu werden vornehmlich kodierende Regionen der rRNA, wie die large subunit (LSU), small subunit (SSU) oder internal transcribed spacer (ITS)-Regionen,

herangezogen. Zur Identifizierung und phylogenetischen Analyse unbekannter Arten in komplexen Mischkulturen werden verstärkt verschiedene Sequenzierungstechniken eingesetzt (Carney *et al.* 2016), während sich für die Detektion bekannter Parasiten die qPCR besonders eignet (Fulbright *et al.* 2014; Grivalský *et al.* 2021; Letcher *et al.* 2013; Shurin *et al.* 2013).

### 1.5.2 Kuratives Kontaminationsmanagement

Bei einer frühzeitigen Detektion einer Infektion können verschiedene generelle reaktive Strategien zum Einsatz kommen (Abbildung 6). Die technisch einfachste und wohl am häufigsten eingesetzte Methode stellt laut Carney und Lane (2014) der sogenannte ‚salvage harvest‘ dar. Dabei wird die Kultur nach Entdeckung einer Infektion komplett abgeerntet, das Anzuchtssystem desinfiziert und ein neuer Kultur-Batch, im Optimalfall mit einer anderen Art, gestartet. So wird ein Totalverlust verhindert, aber Produktionseinbußen und -verzögerungen in Kauf genommen (Carney und Lane 2014).

Mehre chemische und biochemische Zusätze können speziell zur Behandlung einer Infektion mit zoosporenbildenden Wasserpilzen eingesetzt werden: In der Literatur wurden zahlreiche Beispiele zur Wirkung von Kupfersulfat, Natriumhypochlorit, Triton-N, Ozon und anderen Oxidantien beschrieben (Benderliev *et al.* 1993; Karuppasamy *et al.* 2018; Wang *et al.* 2017b). Ein Patent aus dem Jahr 2015 beschreibt die erfolgreiche Behandlung einer Chytridomycose in *Haematococcus pluvialis* Kulturen mit Wasserstoffperoxid (Carney und Sorensen 2015). Obwohl sich der Zusatz von Antibiotika, Bioziden und anderen antimikrobiellen Substanzen im Labor als wirksam erwiesen hat, wird der Einsatz solcher Stoffe im Allgemeinen als umweltschädlich und nicht skalierbar für Kultursysteme zur Algenproduktion angesehen (Fisher und Lane 2019). Der Zusatz von allelochemischen Substanzen, die zur Abwehr beitragen, wird als natürliche Alternative vorgeschlagen (Mendes und Vermelho 2013; Pouneva 2006). Des Weiteren kommen in der Kontaminationsbekämpfung physikalische Methoden zum Einsatz: Zur Zerstörung größerer Organismen eignet sich Ultraschallbehandlung (Holm *et al.*, 2008), diese ist jedoch für Zoosporen aufgrund ihrer kleinen Größe ungeeignet. Außerdem wird vorgeschlagen Kulturen zeitweise mit Ultravioletter Strahlung (UVC) zu bestrahlen, um die, im Gegensatz zu den Algen, nicht pigmentierten und somit ungeschützt Parasiten zu schädigen, oder eine Sterilisation der eingesetzten Medium durch UVC Strahlung (Liebich, Stehouwer and Veldhuis, 2012). Eine weitere Möglichkeit eine Infektion in Mikroalgenkulturen einzudämmen, stellt der Einsatz von Hyperparasiten oder anderen trophischen Kaskaden dar. Solche Regulationsmechanismen sind allerdings bisher nur in Populationsdynamiken von natürlichen System beschrieben und werden bisher nicht in industriellen Anlagen eingesetzt (Kagami *et al.*, 2007; Gleason *et al.*, 2014).

### 1.5.3 Präventives Kontaminationsmanagement

Im Gegensatz zu kurativen Methoden ist das präventive Kontaminationsmanagement dazu in der Lage, Verluste im Vorfeld einer Infektion zu kontrollieren oder ganz zu verhindern. Zu den präventiven Methoden im Kontaminationsmanagement gehören laut Fisher und Lane (2019) auch verfahrenstechnische Methoden, mit denen im Produktionsprozess das Risiko von Infektionen minimiert oder die Auswirkung dieser verlangsamt werden kann (Abbildung 6). Dazu gehört neben der Auswahl robuster Arten, einer Rotation von Algenstämmen oder gar eine Zusammenstellung von diversen Polykulturen, auch beispielsweise die Schaffung einer extremen Kultivierungsumgebung, etwa durch hohe Salinität oder einen alkalischen pH-Wert. Des Weiteren können Algengemeinschaften auch stark über die Zusammensetzung des Kulturmediums (Phosphat-, Nitrat-Quellen und Verfügbarkeit) beeinflusst werden. Außerdem können pH-Spitzen oder CO<sub>2</sub>-Asphyxiation sowohl prophylaktisch als auch aktiv zur prozesstechnischen Eindämmung von Kontaminanten eingesetzt werden (Fisher und Lane 2019; Ganuza *et al.* 2016). Technisch möglich ist auch die Entwicklung von resistenten Stämmen durch genetische Modifizierung oder selektive Auslese (Corcoran *et al.* 2018; Larkum *et al.* 2012).

In den letzten Jahren werden zunehmend Konzepte im Bereich der industriellen mikrobiellen Ökologie und synthetischen Biologie entwickelt, die als kostengünstige und umweltverträgliche Alternative im Kontaminationsmanagement angesehen werden (Beyter *et al.* 2016; Godwin *et al.* 2018; Jackrel *et al.* 2018; Shurin *et al.* 2013; Smith *et al.* 2015; Smith und Crews 2014). In der Ökosystemtheorie umfasst die Stabilität verschiedene Aspekte der Fähigkeit eines Ökosystems hinsichtlich Ökosystemstruktur oder Ökosystemfunktion auf Störungen zu reagieren. Dazu gehört es Störungen des Systems zu widerstehen (Resistenz), sich zeitweise anzupassen (zeitliche Variabilität) oder sich zu davon zu erholen (Resilienz) (Pennekamp *et al.* 2018). Dabei ist es möglich, dass ein Ökosystem oder eine Gemeinschaft stabil in manchen und instabil in anderen Eigenschaften ist. Die Diversitäts-Stabilitäts-Theorie ist dabei ein wichtiger Grundsatz und beruht auf der Annahme, dass eine hohe Artendiversität die Stabilität des Ökosystems erhöht (McCann 2000; Pennekamp *et al.* 2018). Ein positiver Zusammenhang zwischen Artendiversität und Stabilität von Ökosystemen wurde unter anderem auch in natürlichen Phytoplanktonpopulationen nachgewiesen (Ptacnik *et al.* 2008). In den folgenden Konzepten sind einige wichtige Effekte zusammengefasst, die für den Zusammenhang von Stabilität und Diversität verantwortlich gemacht werden. Die ‚Insurance Hypothese‘ besagt, dass sich die Stabilität eines artenreichen Ökosystems gegen Schwankungen der Umweltbedingungen erhöht, da die Wahrscheinlichkeit in diversen Gemeinschaften steigt, dass Arten vorkommen, die verschiedene Eigenschaften und Reaktionsspektren gegen Störungen aufweisen (Leary und Petchey 2009). Außerdem sinkt in

artenreichen Gemeinschaften die Wahrscheinlichkeit, dass wichtige Ökosystemfunktionen verloren gehen, da diese eine höhere Funktionsredundanz mit sich bringen (Naeem und Li 1997). Verschiedene Eigenschaften, die die Fitness von Arten beeinflussen (Licht- und Nährstoffnutzung, Feindinteraktionen, morphologische Variationen, Temperatursensitivität, Reproduktionsstrategien), können nicht unabhängig voneinander betrachtet werden, da sie oft miteinander korreliert sind. Diese sogenannten ‚trade-off‘ Effekte führen zu funktionellen Kompromissen, die unter hohem selektiven Druck entstehen, wenn spezielle Eigenschaften zwar für eine bestimmte Funktion vorteilhaft sind, aber zu Nachteilen bei anderen Funktionen führen (Litchman und Klausmeier 2008). Eine hohe Artenvielfalt, die verschiedene Eigenschaften in unterschiedlichen Kombinationen aufweist, kann diese Effizienzlücken schließen. Unter schwankenden Umweltbedingungen werden folglich abwechselnd verschiedene Arten zu bestimmten Zeiten im Wachstum benachteiligt oder bevorzugt. Das resultiert in Schwankungen der Abundanz einzelner Arten, aber nicht in der Destabilisierung des Ökosystems.

Einige Publikationen der letzten Jahre haben sich vermehrt der Frage gewidmet, ob auch in industriellen Systemen durch die Erhöhung der Diversität eine Produktionssteigerung der Systeme durch die Schließung von Effizienzlücken gemessen werden kann. Beyter und Kollegen (2016) beobachteten die Diversität eines Open Ponds über den Verlauf eines Jahres mittels Sequenzierung von Markergenen und konnten eine Korrelation zwischen hoher Diversität und steigender Biomasseproduktion, sowie niedriger Variation in der Produktionsrate aufzeigen. In einer weiteren Studie konnte in einem Experiment mit verschiedenen Polykulturen gezeigt werden, dass Algenpopulationen, die sich aus verschiedenen Arten zusammensetzen, im Durchschnitt mehr Biovolumen produzieren als der Durchschnitt der Monokulturen (Shurin *et al.* 2014). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass über die reine Diversität hinaus auch die Zusammensetzung und relative Abundanz der Algenarten eine Schlüsselrolle bei der Anwendung von Gemeinschaftsökologie in der Algenbiotechnologie spielt. Im selben Experiment wurde außerdem beobachtet, dass Polykulturen eine höhere Nährstoffaufnahme aufweisen und einen besseren Schutz gegen Prädatoren bieten (Shurin *et al.* 2014). Dieses Ergebnis wird von Untersuchungen gestützt, die aufzeigen konnten, dass der negative Effekt von räuberischem Zooplankton in Polykulturen mit steigender Artenzahl deutlich weniger stark und langanhaltend ausfällt, als bei Monokulturen (Corcoran und Boeing 2012). Weiterhin haben sich Stockenreiter und Kollegen (2012) mit der Auswirkung von Diversität auf die Lipidproduktionsraten von Mikroalgenkulturen beschäftigt. Unter gleichen Wachstumsbedingungen werden hier höhere Lipidproduktion bei höher diversen Polykulturen im Vergleich mit Monokulturen beschrieben (Stockenreiter *et al.* 2012).

---

Auch für die Co-Kultivierung von Mikroalgenkulturen mit assoziierten bakteriellen Mikrobiomen gibt es zahlreiche positive Beispiele (Fisher *et al.* 2019). Fluoreszierende Pseudomonaden gehören zu den PGPB, die eine wichtige Rolle bei der Förderung des Pflanzenwachstums, der induzierten systemischen Resistenz, der biologischen Bekämpfung von Krankheitserregern im landwirtschaftlichen und gartenbaulichen Kontext spielen (Ganeshan und Manoj Kumar 2005; Weller *et al.* 2007). Dass die Wirksamkeit antibiotischer Substanzen von *Pseudomonas fluorescens*-Stämmen, wie z. B. 2,4-Diacetylphloroglucinol (DAPG) auch die Hemmung von Algenpathogenen umfassen, wurde bisher nur für die Braunalge *Saccharina latissima* beschrieben (Nagel *et al.* 2012). Untersuchungen von Fisher und Kollegen konnten zeigen, dass spezifische bakterielle Co-Kulturen mit der Grünalge *Microchloropsis salina* das Abweiden durch des marinen Rädertierchen *Brachionus plicatilis* verhindern können (Fisher *et al.* 2019). Über Genomanalysen von *Azospirillum brasilense* konnte nachgewiesen werden, dass das Phytohormon Indol-3-Essigsäure eine große Rolle bei der Assoziation mit Algenpartnern wie *Chlorella sorokiniana* spielt. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass Indol-3-Essigsäure *in vitro* antagonistische Aktivitäten gegen eine Reihe von Pflanzenpathogenen aufweist, was darauf hindeutet, dass *A. brasilense* neben der Wachstumsförderung auch Biokontrollschutz für Mikroalgen und Pflanzen gegen Pathogene bieten könnte (Cassan *et al.* 2021).

## 1.6 Hypothesen und Forschungsfragen

Ziel dieser Promotionsarbeit ist es, die Auswirkungen der parasitischen Infektionen von *Amoebophilidium protococcarum* AI15TR auf verschiedene Mikroalgenspezies und assoziierte mikrobielle Gemeinschaften zu untersuchen und präventive Behandlungsstrategien zu erproben.

- I. Der unbekannte Wasserpilz AI15TR gehört zur Familie der Aphelidiaceae und weist ein spezifisches Pathogenitätsmuster bei Grünalgen auf. Die Virulenz des Parasiten wird zum einen von der Algenwirtsspezies sowie von der Kultivierungsumgebung beeinflusst. (Kapitel 4.1)
  - a. Welcher Spezies gehört der Aphelidien-Stamm AI15TR an? (Kapitel 4.1.1)
  - b. Wie groß ist das Wirtsspektrum des Aphelidien-Stammes und wie groß sind die Unterschiede der Virulenz bei verschiedenen Algenarten? (Kapitel 4.1.2)
  - c. Welchen Einfluss übt die Kultivierungsumgebung auf das Infektionsgeschehen aus? (Kapitel 4.1.3)
  
- II. Verschiedene Mikroalgenarten sind mit spezies-spezifischen mikrobiellen Gemeinschaften assoziiert. Sowohl die Kultivierungsumgebung als auch eine Aphelidien-Infektion des Algenwirts führt zu Veränderungen des assoziierten Mikrobioms. (Kapitel 4.2)
  - a. Wie unterscheiden sich die bakteriellen Mikrobiome der verschiedenen Algenspezies? (Kapitel 4.2.1)
  - b. Gibt es variable Mitglieder des Mikrobioms, welche sich in Abhängigkeit der Kultivierungsumgebung verändern? (Kapitel 4.2.2)
  - c. Welchen Einfluss hat eine Aphelidien-Infektion mit AI15TR auf die Zusammensetzung des jeweiligen assoziierten bakteriellen Konsortiums? (Kapitel 4.2.3)

- 
- III. Die funktionelle Diversität von infizierten Algenkulturen verändert sich über den Infektionsverlauf mit Aphelidien und das assoziierte Mikrobiom adaptiert sich auf funktioneller Ebene. (Kapitel 4.3)
- a. Welche Veränderungen unterlaufen die Proteinprofile der aphelidien-infizierten Algenkulturen im Vergleich mit nicht infizierten Kulturen? Ist eine Abwehrreaktion der Algen auf die Aphelidien-Infektion zu beobachten? (Kapitel 4.3.1)
  - b. Inwiefern unterscheiden sich die funktionellen Proteinprofile des bakteriellen Mikrobioms zwischen nicht infizierten und infizierten Algenkulturen über den Infektionsverlauf? (Kapitel 4.3.2)
- IV. Präventive Behandlungsstrategien auf Basis von biotischen und abiotischen Kultivierungsfaktoren können zu einer Kontrolle von Aphelidien-Infektionen von Algenkulturen beitragen. (Kapitel 4.4)
- a. Besteht ein direkter Zusammenhang zwischen Algen-Diversität und Stabilität gegen Aphelidien-Infektionen oder ist die Artenkombination in Polykulturen entscheidend? (Kapitel 4.4.1)
  - b. Kann eine Anpassung der prozessimmanenten Kultivierungsbedingungen eine Aphelidien-Infektion in Mikroalgenkulturen reduzieren? (Kapitel 4.4.2)
  - c. Ist eine Co-Kultivierung mit spezifischen protektiven Bakterien vorteilhaft, um den Verlauf einer Aphelidien-Infektion von Algen zu verlangsamen oder die Auswirkungen für die Algenpopulation zu reduzieren? (Kapitel 4.4.3)

## 2 Material und Methoden

In folgendem Abschnitt werden alle in dieser Arbeit verwendeten Methoden näher beschrieben und die verwendeten Geräte, Materialien und Lösungen aufgeführt.

### 2.1 Materialien

Alle verwendeten Lösungen (Tabelle 3), Nährmedien (Tabelle 4-8), Geräte (Tabelle 9) und Algenstämme (Tabelle 10) finden sich nachfolgend dargestellt.

**Tabelle 3: Lösungen zur Extraktion, Quantifizierung und Verdau von Algenproteinen (Heyer et al. 2019)**

Lösung	Bestandteil	Einwaage
0,1 M Ammoniumacetat-Lösung	Ammoniumacetat	0,7708 g
	Methanol	100 ml
2 M Sucrose-Lösung	Sucrose	68,46 g
	H <sub>2</sub> O	100 ml
1 M Sucrose-Lösung	34,23 g Sucrose	34,23 g
	H <sub>2</sub> O	100 ml
Harnstoffpuffer I	8,41 g Harnstoff	8,41 g
	3,04 g Thioharnstoff	3,04 g
	0,2 g Dithiothreitol (DTT)	0,2 g
	Milli-Q Reinstwasser	20 ml
SDS-Laufpuffer (5X):	Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	15 g
	Glycin	72 g
	Natriumdodecylsulfat (SDS)	5 g
	Milli-Q Reinstwasser	1 L
SDS-Lösung	1 g SDS	1 g
	Milli-Q Reinstwasser	10 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8:	Tris	90,75 g
	4 M HCl	pH 8,8
	Milli-Q Reinstwasser	100 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8:	Tris	15 g
	1 M HCl	pH 6,8
	Milli-Q Reinstwasser	100 ml
Bromphenolblau-Lösung	Bromphenolblau	0,5 g
	Milli-Q Reinstwasser	100 ml
SDS-Probenpuffer	0,5 M TRIS-HCl, pH 6,8	12,5 ml
	Glycerol	10 ml
	SDS-Lösung	20 ml
	Mercaptoethanol	5 ml
	Bromphenolblau-Lösung	1 ml
	Milli-Q Reinstwasser	50 ml
APS-Lösung	Ammoniumperoxodisulfat (APS)	1 g
	Milli-Q Reinstwasser	10 ml



<b>Lösung</b>	<b>Bestandteil</b>	<b>Einwaage</b>
Wassergesättigtes Butanol	Butanol	100 ml
	Milli-Q Reinstwasser	100 ml
Gel-Fixierlösung	Essigsäure (100 %)	100 ml
	Ethanol (100 %)	400 ml
	Milli-Q Reinstwasser	500 ml
Coomassie Stock	Coomassie Brilliant Blau G-250	5 g
	Milli-Q Reinstwasser	100 ml
Kolloidaler Coomassie Stock	Ammoniumsulfat	50 g
	Ortho-Phosphorsäure (85 %)	6 ml
	Coomassie Stock	10 ml
	Milli-Q Reinstwasser	484 ml
Kolloidale Coomassie Färbelösung	Kolloidale Coomassie Stock	200 ml
	Methanol (100 %)	50 ml
50 mM ABC Puffer, pH7,9	Ammoniumhydrogencarbonat (ABC)	98,80 mg
	Milli-Q Reinstwasser	25 ml
5 M NaOH	NaOH	20 g
	Milli-Q Reinstwasser	100 ml
0.1 M Tris-HCl, pH 8,5	Tris-HCl	15,7 g
	Milli-Q Reinstwasser	800 ml
	5 M NaOH	pH 8,5
8 M Harnstoffpuffer II	Harnstoff	4,8 g
	0,1 M Tris-HCl, pH 8,5	10 ml
0,40 M DTT Stock	DTT	24,68 mg
	50 mM ABC Puffer	400 µl
40 mM DTT Lösung	0,40 M DTT Stock	100 µl
	8 M Harnstoffpuffer II	900 µl
0,55 M IAA Stock	Iodoacetamid (IAA)	40,7 mg
	50 mM ABC Puffer	400 µl
55 mM IAA Lösung	0,55 M IAA Stock	100 µl
	8 M Harnstoffpuffer II	900 µl
Trypsin-Lösung	lyophilisiertes Trypsin	25 µg
	50 mM Essigsäure	in 25 µl
Extraktionspuffer	50 mM ABC Puffer	1 ml
	Acetonitrile	50 µl
Mobile Phase A	Milli-Q Reinstwasser	1000 ml
	Ameisensäure	1 ml
Mobile Phase B	Milli-Q Reinstwasser	199,2 ml
	Ameisensäure	0,8 ml
	Acetonitril	800 ml

Die Anfertigung der in dieser Arbeit eingesetzten Nährmedien (Tabelle 4-8) erfolgte mit vollentsalztem Wasser. Nach dem Einwiegen und Lösen der Nährsalze wurde der pH-Wert auf 7,0 eingestellt und die jeweiligen Nährmedien in Glasflaschen für 20 min bei 121 °C und 2 bar Druck autoklaviert.

**Tabelle 4: Bolds Basal Medium (BBM) (Bischoff und Bold 1963)**

<b>Bestandteil</b>	<b>Konzentration</b>
NaNO <sub>3</sub>	250 mg/l
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	25 mg/l
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	75 mg/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O	75 mg/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	175 mg/l
NaCl	25 mg/l
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	6 µg/l
MnSO <sub>4</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	12 µg/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	60 µg/l
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	6 µg/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	6 µg/l
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,03 µg/l
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	4,2 mg/l
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	4,8 mg/l
Agar Kobe I (für Agarplatten)	20 g/l
pH	6,8 - 7,2

**Tabelle 5: Modifiziertes BG11 Medium (BG11) (Stanier *et al.* 1979)**

<b>Komponenten</b>	<b>Konzentration</b>
NaNO <sub>3</sub>	1,5 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O	40 mg/l
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	70 mg/l
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	36 mg/l
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	20 mg/l
Zitronensäure	6 mg/l
Ammoniumeisen-(III)-citrat	6 mg/l
EDTA	1 mg/l
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,5 mg/l
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,287 mg/l
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0,169 mg/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,061 mg/l
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,0025 mg/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	0,0125 mg/l

**Tabelle 6: Modifiziertes Setlik Medium (Zachleder und Setlík 1982)**

Komponenten	Konzentration
KNO <sub>3</sub>	2,02 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	340 mg/l
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	999 mg/l
Fe-EDTA	18,5 mg/l
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	10 mg/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,09 mg/l
MnSO <sub>4</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	1,2 mg/l
CoSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	2,35 mg/l
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	1,24 mg/l
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1,43 mg/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	1,84 mg/l

**Tabelle 7: Lysogeny broth (LB) Medium (Bertani 1951)**

Komponenten	Einwaage
Hefeextrakt	5,0 g/l
Trypton	10,0 g/l
Glucose	1,0 g/l
Natriumchlorid	0,5 g/l
Agar Kobe I (für Agarplatten)	20,0 g/l
pH	6,9 - 7,1

**Tabelle 8: Reasoner's 2A agar (R2A) Medium (Sigma Aldrich) (Gibbs und Hayes 1988)**

Bestandteil	Konzentration
Hefeextrakt	0,5 g/l
Proteose Pepton	0,5 g/l
Caseinhydrolysat	0,5 g/l
Glucose	0,5 g/l
Stärke	0,5 g/l
Natriumpyruvat	0,3 g/l
di-Kaliumhydrogenphosphat	0,3 g/l
Magnesiumsulfat	0,024 g/l
Agar Kobe I (für Agarplatten)	20 g/l
pH	7,1 - 7,3

**Tabelle 9: Übersicht über verwendete Geräte**

<b>Gerätekategorie</b>	<b>Gerätebezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
Analysewaage	BP 210 D	Satorius	Göttingen, DE
Analytischen LC-Säule	PepMap Acclaim C18	Thermo Fisher Scientific	MA, USA
Autoklav	VX-150	Systec	Linden, DE
DNA-Extraktion	DNEasy PowerSoil Kit	Qiagen	Venlo, NLD
Filtereinheit 10 kD	Nanosep® Centrifugal Devices	Pall Corporation	New York, USA
Gefrierschrank -20 °C		Beko	Neu-Isenburg, DE
Gefrierschrank -80 °C	ULT 60086V	VWR International GmbH	Darmstadt, DE
Geldokumentation	Molecular Imager® GelDoc™ XR+	Biorad Laboratories GmbH	Feldkirchen, DE
Heizschrank	Model 600	Memmert	Schwabach, DE
Ionenchromatographie	Dionex ICS1100	Thermo Fisher Scientific	MA, USA
Kühlschrank	Profiline	Liebherr	Bulle, DE
Lichtpanel	Epistar LED 6000K	S&W Elektrofachhandel	Berlin, DE
Gefriertrocknung	Beta 2-8 LD plus	CHRIST	Osterode, DE
Magnetrührer	Mix 15	2mag AG	München DE
Massenspektrometer	Q Exactive HF	Thermo Fisher Scientific	MA, USA
Mikroskop	Axio Scope A1	Zeiss	Oberkochen, DE
Mikroskop	BX41	Olympus	Shinjuku, JAP
Mikroskopkamera	Axiocam Erc 5S	Zeiss	Oberkochen, DE
Mikroskopkamera	XC50	Olympus	Shinjuku, JAP
Multifiltrationseinheit	1225	Merck Millipore	MA, USA
Nano-ESI Quelle	TriVersa NanoMate	Advion	Harlow, UK
pH Messgerät	FiveEasy	Mettler Toledo	Gießen, DE
Pipetten	Reference 2	Eppendorf AG	Hamburg, DE
Massenspektrometer	Q Exactive HF	Thermo Fisher Scientific	MA, USA
Mikroplattenreader	Infinite	Tecan Trading AG	Männedorf, CHE
Thermal Cycler	CFX 96 Touch™	Biorad Laboratories GmbH	Feldkirchen, DE
Reinstwasseranlage	Milli Q	Merck Millipore	MA, USA
Schüttelinkubator	Innova 44	New Brunswick Scientific	NJ, USA
Schüttler	KS-15	Edmund Brühler GmbH	Bodelshausen, DE
Schwingmühle	MM200	Retsch GmbH	Haan, DE
Spektralphotometer	DR 6000	Hach Lange HmbH	Berlin, DE
Spektralphotometer	DS-11	Denovix Inc.	Wilmington, USA
Sterilbank	HERA safe KS	Thermo Fisher Scientific	MA, USA
Thermoschüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf	Hamburg, DE
Thermostat	Ecoline RE310	Lauda GmbH & Co. KG	Lauda-Königshofen, DE
Vortex Mixer	ZX4	VELP Scientifica SRL	VELP Scientifica, ITL
Zentrifuge	Multifuge X3R	Thermo Fisher Scientific	MA, USA
µ-LC-Vorsäule	Acclaim PepMap	Thermo Fisher Scientific	MA, USA

Die im Rahmen der Kontaminationsexperimente verwendeten Mikroalgenstämme sind in Tabelle 10 aufgeführt. Bis zur Verwendung wurden diese in der Köthener Algae Strain Collection (KASC) gelagert.

**Tabelle 10: Verwendete Algenstämme mit taxonomischer Zuordnung und Stammsammlungsherkunft**

Spezies	Abkürzung	Gattung	Familie	Ordnung	Klasse	Stamm	Sammlung
<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	Sv	<i>Scenedesmus</i>	Scenedesmaceae	Sphaeropleales	Chlorophyceae	211-8b	SAG
<i>Scenedesmus obliquus</i>	So	<i>Scenedesmus</i>	Scenedesmaceae	Sphaeropleales	Chlorophyceae	276-1	SAG
<i>Desmodesmus quadricauda</i>	Dq	<i>Scenedesmus</i>	Scenedesmaceae	Sphaeropleales	Chlorophyceae	464	CCALA
<i>Tetradesmus wisconsinensis</i>	Tw	<i>Tetradesmus</i>	Scenedesmaceae	Sphaeropleales	Chlorophyceae	3.99	SAG
<i>Spongiochloris</i> sp.	Sp	<i>Spongiochloris</i>	Chlorococcaceae	Chlamydomonadales	Chlorophyceae	29-01	KASC
<i>Chlorococcum</i> sp.	Chl	<i>Chlorococcum</i>	Chlorococcaceae	Chlamydomonadales	Chlorophyceae	5.85	SAG
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Hp	<i>Haematococcus</i>	Haematococcaceae	Chlamydomonadales	Chlorophyceae	34-1a	SAG
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Cs	<i>Chlorella</i>	Chlorellaceae	Chlorellales	Trebouxiophyceae	211-8k	SAG
<i>Parachlorella kessleri</i>	Pk	<i>Parachlorella</i>	Chlorellaceae	Chlorellales	Trebouxiophyceae	04-012	KASC
<i>Stichococcus</i> sp.	St	<i>Stichococcus</i>	Stichococcaceae	Prasiolales	Trebouxiophyceae	30-01	KASC
<i>Botryococcus braunii</i>	Bb	<i>Botryococcus</i>	Botryococcaceae	Trebouxiales	Trebouxiophyceae	var. Showa	

## 2.2 Analytische Methoden

Im nachfolgenden Absatz werden die in dieser Arbeit eingesetzt analytischen Methoden detailliert dargestellt. Alle Schritte, die sterile Bedingungen erforderten, wurden unter einer Sterilwerkbank mit sterilisierten Materialien durchgeführt.

### 2.2.1 Kultivierung von Mikroalgen und Aphelidien

Für die Kultivierung der verschiedenen Mikroalgenstämme, die im Rahmen dieser Arbeit angezogen wurden (Tabelle 10), wurden jeweils frische Flüssigkulturen herangezogen. Dazu wurden die Algenstämme von Schrägagarröhrchen, die der Stammerhaltung der KASC (Koethen Algae Strain Collection) dienen, in einer Sterilwerkbank abgeimpft und Vereinzelungsausstriche auf 2-prozentigen Agarplatten mit Bolds Basal Medium (BBM) (Tabelle 4) erstellt. Die auf den Agarplatten wachsenden Algenkolonien wurden dann sowohl zur weiteren Isolation und Stammerhaltung auf weiteren Agarplatten genutzt, sowie zum Ansetzen frischer Flüssigkulturen herangezogen. Dabei wurde unter einem Inversmikroskop eine saubere Kolonie ausgewählt, diese unter sterilen Bedingungen mit einer ausgeglühten Impföse gepickt und in einem autoklovierten Erlenmeyerkolben mit 100 ml sterilem BBM-Medium überführt. Die Anzucht der Vorkulturen erfolgte für 7 bis 14 Tage bei Raumtemperatur (RT) auf einem beleuchteten Schüttler ( $100 \mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$ , 120 rpm). Für weiterführende Experimente wurden folgende Standard-Kultivierungsparameter angewandt: Die Vorkulturen wurden auf eine Optische Dichte ( $\text{OD}_{750}$ ) von 0,2 eingestellt und in Blasensäulen mit 1,5 l Fassungsvermögen überführt und bei konstanten  $23,5 \text{ }^\circ\text{C}$  und einer Lichtintensität von  $100 \mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$  (weißes Tageslicht - LED) kultiviert. Die Kulturen wurden über den gesamten Zeitraum mit einer Begasungsrate von 1 vvm Druckluft mit Zusatz von 1 %  $\text{CO}_2$  durchmischt.

Alle flüssigen Mikroalgenkulturen wurden mit spezifischen Agar-Nährmedien auf die Anwesenheit von Bakterien und Pilzen überprüft. Dabei wurden R2A (Tabelle 8) und LB-Medium (Tabelle 7) verwendet. R2A-Agar wurde zur Routinekontrolle verwendet, da sich dieses Medium besonders zum Nachweis heterotropher Mikroorganismen in Wasserproben eignet (Gibbs und Hayes 1988). LB-Medium ist ein Standard-Medium für die Kultivierung von Bakterien bzw. Pilzen. Auf eine Agarplatte wurden je 100  $\mu\text{l}$  einer Kulturprobe pipettiert und mit sterilen Glasperlen ausgestrichen. Die Agarplatten wurden anschließend bei RT für eine Woche inkubiert und auf die Ausbildung von Kolonien überprüft. Falls keine Koloniebildung eintrat, wurde die untersuchte Probe auf Kultivierungsebene als kontaminationsfrei angesehen. Da viele Mikroorganismen unter Laborbedingungen nicht kultivierbar sind (Stewart 2012), kann die Kontrolle durch Agar-Nährmedien zu falsch negativen Ergebnissen führen. Aus diesem Grund wurde als zweite Kontrollebene eine mikroskopische Betrachtung

der Kulturen durchgeführt, um diese auf mikrobielle Kontaminationen zu überprüfen. Die Kulturen wurden dabei auf einheitliche Zellmorphologie und auf das Auftreten kleiner Zellen, Artefakte oder Zellaggregation untersucht. Da bakterielle Zellen unter dem Hellfeld schwer zu erkennen sind, wurden die Proben zusätzlich mit dem DNA-Farbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt (AppliChem GmbH, DE). DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff der allgemein zur Visualisierung von Bakterien eingesetzt wird (Porter und Feig 1980). Die mit diesem Farbstoff markierten Zellen erscheinen auf fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen blau und sind dadurch deutlicher zu sehen (Nakajima *et al.* 2005). Für die Anfärbung der Zellen mit DAPI vor der mikroskopischen Betrachtung wurde der Farbstoff zu den Kulturproben in einer Konzentration von 2 µg/ml zugegeben und für 10 min im Dunkeln inkubiert. Die angefärbten Kulturen wurden anschließend unter einem Olympus BX41 Mikroskop mit einem 60x/0,80 Objektiv und einem 100xA/1,25 Öl-Objektiv betrachtet. Die Proben wurden dabei mit einer Nikon Intenslight C-HGFI-Lampe mit einem BV-2A Filterblock (Anregungswellenlänge bei ca. 400-440 nm) beleuchtet. Das emittierte Licht wurde durch einen Longpass-Filter ab einer Wellenlänge von 470 nm sichtbar. Mikroskopische Bilder wurden mit einer XC50 Mikroskopkamera von Olympus aufgenommen.

Als obligate Parasiten sind Aphelidien nicht in der Lage sich ohne ihren Wirt zu vermehren. In Anlehnung an Letcher *et al.* (2013) wurde deshalb das in dieser Arbeit verwendete Aphelidien-Inokulum in Wirtskulturen von *Scenedesmus vacuolatus* herangezüchtet. Zur Herstellung wurden axenische Kulturen von *S. vacuolatus* fünf Tage lang mit den beschriebenen Standard-Standard-Kultivierungsparameter (Kapitel 2.2.1) bis zur exponentiellen Wachstumsphase angezogen. Die Algensuspension wurde dann in 1,4 l Endvolumen auf eine OD<sub>750</sub> von 0,2 mit frischem Medium verdünnt und mit 100 ml *A. protococcarum*-Inokulum (6,6 % v/v) infiziert. Die infizierten Kulturen wurden für sieben bis zehn Tage in Blasensäulen unter Standardbedingungen kultiviert und dann mikroskopisch auf den Infektionsstatus hin untersucht und geerntet, wenn die Algenpopulation vollständig abgestorben war. Dazu wurde die Kultursuspension in sterile Zentrifugationsröhrchen abgefüllt und anschließend bis zur späteren Verwendung bei -80 °C eingefroren. Für die beschriebenen Experimentalkomplexe (Kontaminationsexperimente, Proteomexperimente, Behandlungsexperimente) wurde jeweils Aphelidien-Inokulum aus dem gleichen Batch verwendet, um eine gleichbleibende Zusammensetzung, Zelldichte und Pathogenität des Aphelidien-Stammes AI15TR sicherzustellen und die Vergleichbarkeit der Ansätze zu gewährleisten.

### 2.2.2 Bestimmung des Trockensubstanzgehaltes

Die Bestimmung des Trockensubstanz (TS) - Gehaltes der Algenbiomasse erfolgte anhand Filtration der Kultursuspension durch Glasmikrofaserfilter (1,2  $\mu\text{m}$  Porengröße) nach einer Methode beschrieben durch Moheimani *et al.* 2013 in dreifacher Ausführung. Als Vorbereitung wurden die eingesetzten Filter mehrfach in Reinstwasser gespült und anschließend für mindestens 12 h bei 104 °C getrocknet. Die gewaschenen Filter wurden zur Abkühlung für mindestens 1 Stunde im Exsikkator ausgekühlt und anschließend auf fünf Dezimalstellen genau gewogen (Sartorius BP 210 D). In Abhängigkeit der Zelldichte wurden 2 - 5 ml Algensuspension in einer Multifiltrationsapparatur (Millipore 1225) durch Anlegen eines Vakuums über die vorgewogenen Glasmikrofaserfilter filtriert. Die Filter wurden anschließend, wie zuvor beschrieben, erneut getrocknet und ausgewogen. Der resultierende TS-Gehalt der Algensuspension wurde in Bezug zum eingesetzten Probevolumen in  $\text{g l}^{-1}$  berechnet.

### 2.2.3 Bestimmung der Nährstoffkonzentration

Zur Bestimmung des Nährstoffgehaltes im Kulturmedium während der Versuche wurde ein Ionenchromatographie-System (Dionex ICS 1100, Thermo Fisher Scientific) bestehend aus zwei separaten Teilanlagen zur Trennung und Quantifizierung von An- und Kationen eingesetzt. Die Ionenchromatographie-Systeme wurden im Bereich 1 bis 100  $\text{mg l}^{-1}$  des jeweiligen Ions kalibriert. Als Eluent für Anionen wurde wässriger Carbonatpuffer (4,5 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3/0,8$  mM  $\text{NaHCO}_3$ ) eingesetzt. Die Trennung der einzelnen Anionen erfolgte über eine analytische IonPac AS23 Trennsäulen mit entsprechender Vorsäulen (AG23) und einem AERS 500 Suppressor (alle Säulen von Thermo Fisher Scientific) . Die Analyse der Kationen erfolgte zeitgleich mit 20 mM Methansulfonsäure als Eluent über eine IonPac CS12A Trennsäule mit entsprechender CG12A Vorsäule und einem CERS 500 Suppressor. Die zu analysierenden Nährmedien wurden im Vorfeld zur Abtrennung von Algenzellen filtriert und bezogen auf die Bestimmungsgrenze der Systeme verdünnt. Die Bestimmung des Nährstoffgehaltes erfolgte durchgehend in dreifacher Ausführung.

### 2.2.4 Photometrische Bestimmung der optische Dichte und Chlorophyll-Fluoreszenz

Zur Bestimmung der optischen Dichte ( $\text{OD}_{750}$ ) als Messwert der Zelldichte wurden zwei photometrische Methoden angewandt. Die optische Dichtemessung beruht auf der Lichtstreuung von Teilchen in einer Lösung, die als dimensionsloser OD Wert angegeben wird. Je mehr Teilchen oder Mikroorganismen in einer Lösung suspendiert sind, desto trüber wird die Lösung und umso höher ist folglich der gemessene OD-Wert. Zur Bestimmung der OD wird



Algensuspension photometrisch bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 750 \text{ nm}$  vermessen, um Störeffekte der Chlorophyll-Fluoreszenz bei niedrigeren Wellenlängen auszuschließen. Zur Bestimmung des Blindwerts wurde BBM verwendet. Ab einem  $OD_{750}$ -Wert von 0,4 wurden die Probe vor der Messung mit BBM verdünnt, um im linearen Messbereich der Geräte zu messen. Die Bestimmung erfolgte durchgehend in dreifacher Ausführung. Die OD-Messung erfolgte für alle Proben der Kontaminationsexperimente an einem DR6000 UV-VIS Spektralphotometer (Hach Lange GmbH) mithilfe von Makroküvetten. Während der Proteom- und Behandlungsexperimente erfolgte die Messung der OD wiederum an einem Infinite Mikroplattenreader (Tecan Trading AG).

Die Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz ist ein Parameter der oftmals zur Beobachtung des Zellwachstums in Algenkulturen angewendet wird (Malapascua *et al.* 2014). Mit fortschreitendem Algenwachstum nimmt die Intensität der Chlorophyll-Fluoreszenz in den Kulturproben zu. Da Chlorophyll bei der Infektion mit Aphelidien durch Phagozytose der Chloroplasten sehr schnell abgebaut werden, lassen sich mit dieser Methode außerdem indirekt Rückschlüsse auf das Fortschreiten der Infektion in den Algenzellen ziehen. Die Chlorophyll *a* -Fluoreszenz ( $E_{685}$ ) der Algensuspension wurde jeweils in Triplikate in 96-Well Platten mit einem Infinite M200 Microplate Reader von Tecan (Tecan, Männedorf, CHE) gemessen. Dabei wurden je 200  $\mu\text{l}$  Kulturprobe in ein Well pipettiert und mit einer Wellenlänge von 440 nm angeregt. Die Emission wurde bei 685 nm mit einer Bandweite von 20 nm und einer Integrationszeit von 20  $\mu\text{s}$  gemessen. Zur Bestimmung des Blindwerts wurde BBM verwendet.

### 2.2.5 Mikroskopische Bestimmung von Zellzahl und Detektion von Aphelidien

Die direkte mikroskopische Auszählung der Algenzellen wurde in einer Bürker Zählkammer verwirklicht. Zur Bestimmung von Monospezieskulturen wurden die Zellzahlen direkt am Axoscope A1 (Zeiss) ermittelt. Zur Zuordnung und Zählung der Algenzellen einer bestimmten Spezies in Polykulturen wurden zunächst Photographien der Zählkammern mit einer AxioCam Erc5S aufgenommen und später digital ausgewertet. Die Algenzellen jeder Probe wurden von mindestens acht Gruppenquadraten randomisiert ausgezählt. Die Zellzahl/ml berechnet sich aus der Anzahl der gezählten Zellen, dem Verdünnungsfaktor, der Anzahl der Quadrate und dem Volumen der Quadrate (Bürkerzählkammer = 0,004  $\text{mm}^2$ )

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{Zellzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Anzahl gezählter Quadrate} \times \text{Volumen der Quadrate (0,004 mm}^2\text{)}}$$

Da Aphelidien-Zysten klein und farblos sind, sind sie besonders auf mikroskopischen Hellfeldaufnahmen schwer zu erkennen. Zur Verbesserung der Sichtbarkeit der farblosen Zysten, wurde eine Färbung der infizierte Algenkulturen mit Weizenkeim-Agglutinin mit Fluorescein-Konjugat (WGA-FITC) durchgeführt (LINARIS GmbH, Kat. Nr. FL-1021-5). WGA-FITC kann zur Markierung von chitin-haltigen Aphelidien-Zysten eingesetzt werden (Torruella *et al.* 2018), indem es an Monomereinheit N-Acetylglucosamin des Polymers Chitin bindet (Peters und Latka 1986). Wenn das im Konjugat enthaltene Fluorescein mit blauem Licht angeregt wird, wird grünes Licht in den chitinhaltigen Zysten emittiert. Gleichzeitig wird durch die Bestrahlung mit blauem Licht die rote Autofluoreszenz der Chlorophylle in den Algenzellen angeregt (Burkart *et al.* 2014). Der Farbstoff wurde zu 1 ml Algensuspension in einer Endkonzentration von 10 µg/ml zugegeben. Die Probe wurde bei Raumtemperatur im Dunkeln für ca. 10 min inkubiert und anschließend für 1 min bei 3500 g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 1mL BBM resuspendiert. Zur Untersuchung der angefärbten Zellen wurden ein Olympus BX41 Fluoreszenzmikroskop mit einem 60x/0,80 Objektiv bzw. einem 100xA/1,25 Öl-Objektiv eingesetzt. Eine Als Nikon Intenslight C-HGFI-Lampe mit einem GFP-30LP-B-0000 Filterblock diente als Lichtquelle. Die Lichtanregung erfolgte mit einer Wellenlänge von 460°-°490 nm und emittiertes Licht wurde durch einen Longpass-Filter ab einer Wellenlänge von 510 nm sichtbar gemacht.

In einigen Experimenten wurde die Anzahl der gesunden, infizierten und abgestorbenen Zellen identifiziert. Dazu wurden die Kulturproben mit WGA gefärbt und mittels Fluoreszenzmikroskopie bei einer Anregung von 460-490 nm die grün eingefärbten Zysten sowie die rote Autofluoreszenz der Algenzellen sichtbar gemacht. Dabei wurden Algenzellen als ‚gesund‘ angesehen, wenn eine intakte Morphologie vorlag, während bei infizierten Zellen ein sichtbarer Rückgang des Chloroplasten sowie aufsitzende Aphelidien-Zysten zu entdecken waren. Als vollständig abgestorben wurden die Zellen dann verrechnet, wenn die Phagozytose des Zellinneren so weit fortgeschritten war, dass keine Chlorophyll-Autofluoreszenz mehr zu erkennen war. Die Zellzahl/ml wurde für jede Zellkategorie wie oben beschrieben berechnet und dann anhand der Gesamtzellzahl prozentual ins Verhältnis zueinander gesetzt.

#### 2.2.6 Berechnung der Pathogenität und Virulenz von infizierten Algenkulturen

Um den Verlauf einer Infektion mit *A. protocoocarum* bei verschiedenen Algenspezies und unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen vergleichen zu können, werden verschiedene epidemiologische Kenngrößen herangezogen.

Die Pathogenität bezeichnet die grundsätzliche Fähigkeit eines Pathogens Infektionen bei bestimmten Organismen hervorzurufen zu können und stellt somit ein absolutes Maß der Wirtsspezifität dar. Sie wird folglich bezogen auf einen möglichen Wirt mit Null oder Eins bewertet. In dieser Arbeit werden dazu mikroskopische Betrachtungen der typischen morphologischen Veränderungen der Algenzellen herangezogen, da diese eine direkte Identifikation einer Aphelidien-Infektion zulassen.

Als Maß der Pathogenität, also dem Grad der Beeinträchtigung bei infizierten Organismen, wird die Virulenz bezeichnet. Diese kann sich bei einer Infektion mit Aphelidien durch einen Rückgang der Trockensubstanz der Algenkulturen ( $V_{TS}$ ), der optischen Dichte ( $V_{750}$ ) oder den Rückgang der Chlorophyll *a* Fluoreszenz ( $V_{685}$ ) innerhalb eines festgesetzten Zeitraumes bemerkbar machen. Für die Berechnung der Virulenz werden hier über die Versuchsdauer beispielsweise Differenzen des Trockensubstanzgehaltes ( $\Delta TS = TS_{T7} - TS_{T0}$ ) von aphelidien-infizierten (AI) und nicht infizierten (NI) Kulturen gebildet. Die Differenz zwischen nicht infizierten und infizierten wird dann zueinander ins Verhältnis gesetzt, um die Schädigung der infizierten Kulturen anhand der Trockensubstanz der nicht infizierten Kulturen proportional einzuschätzen. Dieselbe Rechnung kann auch auf die  $OD_{750}$  ( $V_{750}$ ) oder  $E_{685}$  ( $V_{685}$ ) wie beschrieben durchgeführt werden.

$$Virulenz_{TS} (V_{TS}) = \frac{\Delta TS_{NI} - \Delta TS_{AI}}{\Delta TS_{NI}}$$

Eine weitere Möglichkeit zum Vergleich des Infektionsverlaufes unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen stellt die Infektionsgeschwindigkeit bis zum Absterben der Algenkultur dar. Dazu wird die Virulenz in Abhängigkeit der Dauer des Rückganges der Chlorophyll *a* Fluoreszenz ( $\Delta E_{685}$ ) betrachtet. Da dies ein sich an Null annähernder Prozess ist, wird zur präziseren Einschätzung der Zeitpunkt berechnet, zu dem ein Rückgang der  $E_{685}$  um 50 % erreicht ist, also eine Virulenz von 50 % vorliegt ( $V_{50}$ ). Diese Berechnung erfolgt in Anlehnung an klassische Dosis-Wirkungs-Bioassays zur Abschätzung von LD(50) oder LC(50), also der Dosis oder Konzentration, die erforderlich ist, um 50 % der exponierten Wirte zu töten (Thomas und Elkinton 2004). Dazu wurde der  $E_{685}$  Rückgang bei infizierten Kulturen mittels DoseResp Model gefittet und der LogX0 des Modells in Origin berechnet. Der LogX0 stellt im verwendeten Model den Wendepunkt der Funktion dar und markiert somit den Zeitpunkt, bei dem ein Rückgang um 50 % zu verzeichnen ist und wird deshalb als  $V_{50}$  bezeichnet. Je früher dieser Wert erreicht ist, desto schneller läuft die Infektion ab.

### 2.2.7 DNA-Extraktion und Qualitätskontrolle

Zur Extraktion bakterieller und pilzlicher Desoxyribonukleinsäure (DNA) wurde ein Extraktionskit für Bodenproben (DNeasy® PowerSoil) von Qiagen eingesetzt, das sich eignet, um schwer aufschließbare und stark verunreinigte Biomassen aufzuschließen und bereits in der Literatur zu Detektion von Aphelidien-DNA eingesetzt wurde. Dafür wurden 10 ml Algensuspension bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und in 250 µl Reinstwasser rückgelöst. Die konzentrierte Probe und 800 µl der Lösung CD1 wurden in ein PowerBead Tube pipettiert. Die Reaktionsgefäß wurden in eine Schwingmühle MM200 (Retsch) eingespannt und für 10 min bei 30 Hz geschüttelt. Anschließend wurden die Reaktionsgefäß bei 15.000 x g für 1 min zentrifugiert, um Zellbruchteile zu sedimentieren. Bis zu 600 µl des Überstands wurde in ein neues Reaktionsgefäß (2 ml) überführt, 200 µl Lösung CD2 hinzugegeben und zum Mischen kurz gevortext. Die Reaktionsgefäß wurden anschließend 15.000 x g für 1 min zentrifugiert. Der Überstand (700 µl) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 600 µl der Lösung CD3 zugegeben und wiederum für 5 s zum Mischen gevortext. Von diesem Lysat wurden 650 µl auf die Spin Column geladen und bei 15.000 x g für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und der Schritt wiederholt, bis das gesamte Volumen des Lysats auf die Säule geladen ist. Die Säulchen werden vorsichtig auf neue Reaktionsgefäß überführt und dann 500 µl der Lösung EA zugegeben. Die Reaktionsgefäße mit Säulen werden bei 15.000 x g für 1 min zentrifugiert und der Durchfluss anschließend verworfen. Anschließend wurden 500 µl der Lösung C5 auf die Säulchen pipettiert und erneut zentrifugiert (15.000 x g für 1 min). Der Durchfluss wird verworfen und die Reaktionsgefäß wurden leer bei 16.000 x g für 2 min zentrifugiert, um verbleibende Waschlösung restlos zu entfernen. Die Spin Säulen wurden danach in ein neues Reaktionsgefäße (1,5 ml) überführt und für 5°-10 min mit offenen Deckeln getrocknet. Abschließend wurde 50 µl Solution C6 in die Mitte des Membranfilters der Säule pipettiert, für 5 min inkubiert und dann bei 15.000 x g für 1 min zentrifugiert. An dieser Stelle wurden die Extrakte bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20 °C aufbewahrt.

Zur ersten Kontrolle des Extraktionserfolges wurde die Qualität und Quantität der DNA-Extrakte mittels photometrischer Messung (Devonix DS-11) bei 230, 260 und 280 nm bestimmt. Nukleinsäuren adsorbieren Licht bei 260 nm, wobei dieser Wert durch Verunreinigungen, wie Proteine (280 nm) und Phenole (230 nm), die bei der Extraktion nicht entfernt werden konnten, gestört werden kann. Die Quotienten dieser Werte liefern Informationen über den Reinheitsgrad der Proben: Ein Wert um 1,8 des 260/280 Quotienten gilt als reine DNA, während beim 260/230 Quotienten die Werte im Bereich von 1,8 - 2,2 liegen sollten.

### 2.2.8 PCR und Sequenzierung von Aphelidien-DNA

Um die Infektion von Aphelidien molekular nachzuweisen, wurde eine für Pilze spezialisierte quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) mit DNA-Extrakten aus infizierten Algenkulturen durchgeführt. Dazu wurden die DNA-Extrakte als Template laut Mastermix-Rezepts (Tabelle 11) in die Reaktion eingesetzt und die qPCR Anhand der in Tabelle 12 aufgeführten Protokolle in einem CFX 96 Touch Cyclyer (Biorad) durchgeführt.

**Tabelle 11: Zusammensetzung und Konzentration der Mastermix-Komponenten für q-PCR Reaktionen**

Reagenzien	Endkonzentration	1 Reaktion [µl]
iTaq Universal SYBR Green	1x	10
Forward Primer	0,3 µM	1,2
Reverse Primer	0,3 µM	1,2
TaqMaster PCR Enhancer (5x)	1x	4
DEPC-H <sub>2</sub> O (Nuclease free)	-	2,6
Mastermix	-	19
Template DNA	-	1
<b>Endvolumen</b>	-	20

Das Primerpaar UF1 (5'-CGAATCGCATGGCCTTG-3') und AU4 (5'-RTCTCACTAAGCCATTC-3') (Karpov et al. 2017a) wurde eingesetzt um das 18S rRNA-Gen zu amplifizieren. Die Bereiche der 18S, ITS1, 5,8S, ITS2 und 28S rRNA Gen-Regionen wurden mit dem Primerpaar ITS1f (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') und ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Ihrmark et al. 2012) amplifiziert.

**Tabelle 12: qPCR Programm zur Identifikation von Aphelidien**

UF1/AU4		ITS1f/ITS4		Funktion	Anzahl
Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit		
94 °C	120 s	94 °C	300 s	Initiale Denaturierung, Aktivierung Polymerase	1x
94 °C	15 s	94 °C	30 s	Denaturierung	40x
50 °C	30 s	58 °C	30 s	Primer-Hybridisierung	
72 °C	120 s	72 °C	30 s	Elongation	
72 °C	420 s	72 °C	420 s	Elongation	1x
4 °C	∞	4 °C	∞	Kühlung	

Die PCR-Produkte wurden mit einem 1 %-igen Agarose-Gel kontrolliert. Für die Herstellung eines Gels wurden 1 g Agarose in 100 ml 1x TRIS-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer durch Erwärmen gelöst. Vor dem Gießen wurden 5 µl Roti®-Safe GelStain (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE) zur Anfärbung der DNA zum Gel zugegeben. Vor dem Beladen der Geltaschen

wurden jeweils 8 µl des PCR-Produkts mit 2 µl 1x Probenpuffer Roti®-Load (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE) vermischt. Als Größenmarker wurden 6 µl GeneRuler 1 kb DNA Ladder und GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific™) verwendet. Danach wurden die PCR-Produkte über das Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Mannheim, DE) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte über eine Sanger-Sequenzierung durch das Unternehmen Microsynth Seqlab. Die Auswertung der erhaltenen Elektropherogramme wurde mit dem Programm Chromas 2.6.6 (Technelysium Pty Ltd., South Brisbane, AU) umgesetzt. Mittels der NCBI-Datenbank BLASTn wurden die ermittelten Sequenzen des Aphelidien-Stamm AI15TR auf Ähnlichkeiten zu bereits bekannten Sequenzen geprüft. Die Sequenz des 18S rRNA Gens wurde zusätzlich einer phylogenetische Verwandtschaftsanalyse unterzogen. Diese wurde anhand von 16 Referenzsequenzen mit dem Programm MEGA-X (Kumar et al. 2018) unter Anwendung der Most-Likelihood-Methode durchgeführt.

#### 2.2.9 16S-rRNA Illumina Sequenzierung und Sequenzdatenanalyse

Der v2 500 Sequenzierlauf auf der Miseq Illumina Platform, sowie die anschließende Prozessierung der Sequenzdaten wurden von der Firma Microsynth (Balgach, CHE) anhand der in-house Protokolle vorgenommen, die im Anhang zu finden sind.

Die Sequenzen der so ermittelten Operational Taxonomic Units (OTUs) wurden mit der SILVA 16S Datenbank verglichen und mit dem SINA aligner (v1.2.11) Taxonomien über 70 % Identitäts-Übereinstimmung zugeordnet (Pruesse *et al.* 2012). Bakterielle OTUs, die nicht mit höherer Auflösung zugeordnet werden konnten, werden im Folgenden als „unbekannte Bakterien“ bezeichnet. Basierend auf den OTU-Sequenzen wurde ein MUSCLE-Alignment (Edgar 2004) mittels ‚Neighbor-Joining‘-Methode (Saitou und Nei 1987) in MEGA X (Kumar *et al.* 2018) berechnet. Das Alignment wurde verwendet, um einen phylogenetischen Baum anhand der ‚Maximum Likelihood‘-Methode mit ‚General time-reversible‘-Model zu berechnen (Waddell und Steel 1997). Die relativen Häufigkeiten wurden auf Basis der absoluten OTU-Tabelle berechnet und für anschließende Analysen herangezogen.

#### 2.2.10 Multivariate Analyse der Zusammensetzung der Mikroalgemeinschaft

Die Zusammensetzung und Struktur der Bakteriengemeinschaften basierend auf den Sequenzdaten wurde mit dem Biokonduktor Paket Phyloseq (v 1.28.0) (McMurdie und Holmes 2013) analysiert und mit dem implementierten Paket ggplot2 (v3.3.2) (Wickham 2016) auf der Open-Source Plattform R visualisiert (v3.6.1).

Dazu wurde zunächst basierend auf der OTU-Tabelle, in der für jede zugeordnete Spezies eine Abundanz pro Probe aufgeführt ist, verschiedene Diversitätsindices errechnet. Der Shannon-Index wurde zur Einschätzung des Artenreichtums und der Evenness herangezogen, während mit Chao1 die Anzahl der Arten in einer Gemeinschaft basierend auf den Arten mit geringer Häufigkeit geschätzt wird (Kim *et al.* 2017). Zur Bestimmung der Struktur der bakteriellen Gemeinschaft wurden Bray-Curtis-Dissimilarity und gewichtete UniFrac Distanzmetriken berechnet und mittels nichtmetrischer multidimensionaler Skalierung (NMDS) berechnet und visualisiert. Während die Bray-Curtis-Dissimilarity nur Häufigkeitsdaten erfasst, fließen in die Berechnung der gewichteten Unifrac-Matrix auch phylogenetische Informationen zur Berechnung der Entfernungen der Proben ein (Lozupone und Knight 2005). Zusätzlich wurde ein PERMANOVA-Test (ADONIS) im vegan Paket (Oksanen *et al.* 2019) zur statistischen Überprüfung des Einflusses von Algenart, Inkubationszeit und Kultivierungsbedingungen auf die Struktur der bakteriellen Gemeinschaft ausgeführt. Relative OTU-Abundanzen der 20 häufigsten Gattungen jeder Algenart wurden in Histogrammen dargestellt. Seltene Gattungen, die weniger als 1 % Abundanz aller Proben, die zu einer Algenart gehören umfassen, wurden als Summenparameter in der Kategorie „Andere <1 %“ zusammengefasst. Darüber hinaus wurde der Anteil gemeinsamer und einzigartiger OTUs bestimmt, die in der bakteriellen Gemeinschaft verschiedener Probengruppen (Algenspezies oder Kultivierungsbedingungen) vorhanden sind. Das proportionale Vorkommen der bakteriellen OTUs in verschiedenen Probengruppen wurde mit dem EulerR-Paket (v6.1.0) in einem VENN Diagramm aufgetragen, um darzustellen wie groß die Übereinstimmung der mikrobiellen Gemeinschaften in Abhängigkeit der Algenspezies oder Kultivierungsbedingungen ist (Larsson 2020).

#### 2.2.11 Analyse des potenziellen Funktionsprofils des bakteriellen Mikrobioms

Die metabolisch und ökologisch relevanten Funktionen aller in der Mikroalgen-Gemeinschaft aufgefundenen bakteriellen OTUs wurden mithilfe der FAPROTAX Datenbank (Louca *et al.* 2016) mittels des MACADAM Web Interfaces auf Gattungs-Level ermittelt (Le Boulch *et al.* 2019). Im Folgenden wurden die Funktionen aller vorkommender Gattungen aus einer Probe zu einem Funktionsprofil vereint. Eine Funktion wurde als in der Probe vorhanden angesehen, wenn einer oder mehrere Gattungen, die über diese Funktion verfügen, in dieser Probe vorkamen. Die Funktionsprofile wurden anhand Kultivierungsbedingungen zu verschiedenen Probengruppen (Algenspezies, Infektion oder Kultivierungsbedingungen) zugeordnet. Das prozentuale Vorkommen der Funktionen in einer Probengruppe, sowie die Abweichungen zwischen den Gruppen wurden in Excel ermittelt (Microsoft, Washington, USA).

### 2.2.12 Netzwerkeanalyse der bakteriellen Mikroalgen-gemeinschaft

Die Netzwerkanalyse bakterieller OTUs wurde mit der Software Cytocype (v 3.7.2) und dem Add-In CoNet (Faust und Raes 2016) durchgeführt. Für jede Mikroalgen-spezies wurden einzelne Netzwerke berechnet, um die durch die Kultivierungsbedingungen bedingten Verschiebungen in den OTU-Interaktionsmustern zu analysieren. Die relativen OTU-Abundanzen der vier Algen wurden in CoNet geladen, einschließlich der jeweiligen taxonomischen Zugehörigkeiten und Kultivierungsbedingungen (Infektion und Kultivierungsumgebung). Die vorläufigen Netzwerke wurden mit Pearson- und Spearman-Korrelation, Bray-Curtis- und Steinhaus-Dissimilarity sowie Hellinger-Distanz berechnet, da diese Methoden robust und unempfindlich gegen hohe Frequenzen von Nullwerten sind. Der Schwellenwert wurde auf 2000 obere und untere Edges festgelegt. Es wurden nur Interaktionen bakterieller OTUs berücksichtigt, die durch mindestens vier von allen fünf Korrelationsmethoden unterstützt wurden, was die Robustheit der Interaktion erhöht. Signifikante Wechselwirkungen ( $p \leq 0,05$ ) für alle Netzwerkkanten wurden durch einen Permutationstest mit 100 Iterationen und einer Matrixzeilen-basierten Resampling-Methode getestet. Danach wurden edge-spezifische Konfidenzintervalle durch ein Bootstrapping-Verfahren mit 100 Iterationen berechnet. Schließlich wurde eine multiple Testkorrektur (Benjamini und Hochberg 1995) und eine edge-spezifische p-Wert-Merge-Methode (Brown 1975) durchgeführt und das endgültige Netzwerk berechnet. Jeder Knoten des endgültigen Netzwerks wurde mithilfe des GLay-Community-Algorithmus einem bestimmten Modul zugeordnet (Su *et al.* 2010). Anschließend wurden die Intramodularität ( $Z_i$ ) und Intermodularität ( $P_i$ ) wie zuvor beschrieben berechnet (Guimerà und Nunes Amaral 2005). Die Zuordnung zu Netzwerkmodule erfolgte wie in Olesen *et al.* 2007 beschrieben (Olesen *et al.* 2007).

### 2.2.13 Protein-Extraktion, Proteinquantifizierung und tryptischer Verdau

Die Extraktion erfolgte nach Heyer *et al.* mit wenigen spezifischen Modifikationen zur Anpassung an Algenbiomasse (Heyer *et al.* 2019). Dafür wurden je 500 ml Algensuspension bei 10.000 g zentrifugiert und aufkonzentriert. Der Überstand wurde verworfen und die Algenmasse in 5 ml Reinstwasser rückgelöst. Die Extraktion der Proben erfolgte stets in Triplikaten. Die Einwaage von 400 mg aufkonzentrierter Algensuspension wurde mit 400  $\mu$ l 2 M Saccharoselösung, ca. 1 g Zirkoniumbeads sowie 800  $\mu$ l Aqua-Phenol versetzt. Die mechanische Zellyse erfolgte für 20 min bei Raumtemperatur und 30 Hz in der MM200 Schwingmühle (Retsch). Zur Phasentrennung wurden die Lysate bei 10.000 x g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (Multifuge X3R). Es wurden 600  $\mu$ l der oberen, proteinhaltigen



Phenolphase abgenommen und 600 µl 1 M Saccharoselösung zugegeben und für 10 min bei Raumtemperatur und 5 Hz in die Schüttelmühle inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 10.000 x g für 10 min wurden 500 µl des Phenolüberstandes abgenommen und mit 1,5 ml 0,1 M methanolischer Ammoniumacetatlösung versetzt. Die Proteinpräzipitation fand durch Inkubation bei -20 °C für mindestens 1 h statt. Im Anschluss wurden die Proben für 10 min bei 10.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Proteinpellet wurde nacheinander jeweils zweimal mit 500 µl 80 %-igem Aceton und 70 %-igem Ethanol gewaschen. Nach jedem Waschschrift erfolgte eine Inkubation für 15 min bei -20 °C und eine anschließende Zentrifugation mit 12.000 x g bei 4 °C für 5 min. Die Proteinpellets wurden zunächst für 30 min im Exsikkator getrocknet, um Reste der Wachlösung zu entfernen und anschließend mit 1000 µl Harnstoffpuffer I und ca. 1 g Silika-Perlen versetzt. Zur Resuspension des Pellets wurden die Proben für 5 min in der Schüttelmühle bei 30 Hz gebrochen, über Nacht inkubiert und erneut für 3 min geschüttelt. Restliche Feststoffe wurden für 5 min bei 10.000 x g und 4 °C sedimentiert, der Überstand abgenommen und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die Proteinbestimmung der Extrakte wurde mittels Roti-Nanoquant-Färbung (Carl Roth GmbH) nach Herstelleranleitung durchgeführt. Dabei beruht die Quantifizierung auf einer modifizierten Version der Bradford Methode. Dazu wurden 10 µl der Extrakte mit 40 µl Reinstwasser (1:5) verdünnt und in Triplikaten mit dem 5-fachen Volumen (200 µl) der verdünnten Nanoquant-Arbeitslösung versetzt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die photometrische Messung (Tecan) der Proteinkonzentration erfolgt in einer 96-Well Mikrotiterplatte (Brandt) bei 450 und 590 nm. Außerdem wurde eine Kalibriergerade mit BSA-Lösungen verschiedener Konzentrationen von 0 µg/ml bis 150 µg/ml (in Schritten von je 5-25 µg/ml). Zur Auswertung der Daten wurde der Quotient der optischen Dichten ( $OD_{590}/OD_{450}$ ) gebildet und anhand der Steigung der Kalibriergeraden die Proteingehalte der Extrakte berechnet.

Außerdem wurde die Qualität der Extrakte mittels SDS-Page überprüft. Dafür wurden die Extrakte auf identische Proteinkonzentration gebracht. Das Probevolumen, das 55 µg entspricht wurde mit der gleichen Menge Reinstwasser verdünnt und mit dem 5-fachen Volumen eiskaltem Aceton für mindestens 1 h bei -20 °C gefällt. Die Proteine wurden durch Zentrifugation bei 16.400 x g für 30 min bei 4 °C pelletiert und das Pellet nach Verwerfen des Überstandes für ca. 1 h im Exsikkator getrocknet. Die Pellets werden in je 22 µl SDS-Probenpuffer 5 min bei 60 °C und 1400 rpm auf einem Thermomixer suspendiert. Die Proben werden bei 16.400 x g für 10 min zentrifugiert und 20 µl der Probe (=50 µg Protein) werden in die Taschen des SDS-Gels aufgetragen. Das Gel setzte sich aus einem 4 %-igem Sammel- und einem 12 %-igem Trenn-Acrylamidgel zusammen (Tabelle 13).

**Tabelle 13: Zusammensetzung des 4%/12%-SDS-Gels zur Auftrennung der Proteinextrakten**

1mm Acrylamidgel	12 %-Trenngel [ml]	4 %-Sammelgel [ml]
Reinstwasser	2,23	2,03
1,5 M Tris-HCL pH 8,8	1,67	-
0,5 M Tris-HCL pH 6,8	-	0,83
SDS 10 %	0,07	0,03
Polyacrylamid	2,67	0,43
APS	0,05	0,025
Tetramethylethyldiamin	0,005	0,005
Bromphenolblau	-	0,013
Gesamtvolumen	6,69	3,38

Die Aufreinigung erfolgte bei konstanter Stromstärke von 10 mA pro Gel bis die Lauffront das Trenngel erreicht. Dann wurde die Stromstärke auf 20 mA pro Gel erhöht bis die Lauffront das untere Ende der Platten fast erreicht. Die Gele wurden zunächst für mindestens 1 h mit Fixierlösung bei 20 rpm im Wippschüttler fixiert, mit Reinstwasser gewaschen und anschließend mit kolloidalen Comassie-Lösung für mindestens 1 h bei 20 rpm gefärbt und erneut mit Reinstwasser gewaschen. Die Visualisierung der Gele erfolgte mit einem handelsüblichen Scanner.

Der tryptische Verdau der Proteinextrakte wurde in-solution mittels ‚Filter Aided Sample Preparation‘ (FASP) in Anlehnung an das von Wisniewski veröffentlichte Protokoll durchgeführt (Wisniewski *et al.* 2009). Die Extrakte wurden dazu jeweils mit Harnstoffpuffer II auf eine Proteinkonzentration 0,1 µg/µl eingestellt. Davon werden je 500 µg (=50 µg) auf eine Nanosep-Filtereinheit (10 K Dalton) transferiert und für 15 min bei 10.000 x g RT zentrifugiert. Die Filtermembran wird mit 200 µl Harnstoffpuffer II beladen und erneut für 15 min bei 10.000 x g RT zentrifugiert. Der Durchfluss wird jeweils verworfen. Danach werden 100 µl DTT-Lösung auf den Filter gegeben, 1 min bei 800 rpm auf dem Thermomixer geschüttelt und dann 20 min mit sanftem Schütteln (300 rpm) bei 56 °C inkubiert, um die Proteine zu reduzieren. Die Filtereinheit wird bei 10000 x g für 15 min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Um eine Alkylierung der Proben zu erreichen wird dieser Schritt anschließend mit 100 µl IAA Lösung im Dunkeln wiederholt. Die Filtereinheit wird nun mit 100 µl Harnstoffpuffer II gewaschen, indem 2 min bei RT auf einem Thermomixer inkubiert und dann 5 min bei 10000 x g zentrifugiert wird. Die Filtereinheiten werden noch drei mal auf die gleiche Weise mit 100 µl ABC Puffer gewaschen, der Durchfluss wird jeweils verworfen. Der untere Teil des Reaktionsgefäßes wird mit 250 µl ABC-Puffer waschen und anschließend vollständig entleert. Die Trypsin-Lösung wird hergestellt indem zunächst 25 µg lyophilisiertes Trypsin in 25 µl 50 mM Essigsäure gelöst und dann pro Probe 0,5 µl der Trypsinlösung mit 199,5 µl ABC-

Puffer verdünnt wird (Enzym:Substrat-Verhältnis 1:100). Dann werden je 200 µl der Trypsin Arbeitslösung auf die Membran der Filtereinheit gegeben und über Nacht (mindestens 12 h) bei 37 °C mit sanftem Schütteln bei 300 rpm inkubiert. Die Elution erfolgt in drei Schritten: Die Filtereinheiten werden bei 10000 x g für 5 min zentrifugiert, um das Lysat aus den Filtern zu drücken. Dann wurden erneut 50 µl Extraktionspuffer auf die Filtereinheit gegeben und erneut bei 10000 x g für 5 min zentrifugiert. Der Durchfluss wird dabei vereint. Dieser Schritt wird anschließend nochmals mit 50 µl LC-MS-grade Reinstwasser wiederholt. Die verdauten Proteine befinden sich nun im gesammelten Durchfluss und können bei -20 °C zur weiteren Verarbeitung gelagert werden.

#### 2.2.14 Massenspektrometrische Analyse von Proteinextrakten

Vor der Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie-Analyse (nanoLC-MS/MS) wurden die Peptidlysate mit 0,1 %iger Ameisensäure angesäuert. Zur Vorreinigung wurden 5 µl der Peptid-Lysate zunächst 5 Minuten lang mit einer Mischung aus 4 % mobiler Phase B und 96 % mobiler Phase A auf die Vorsäule (µ-Precolumn, Acclaim PepMap, innerer Durchmesser 75 µm, 2 cm, C18, Thermo Scientific) geladen. Die Separation der Peptide erfolgte über einen linearen Gradienten (150 min) der mobilen Phase B (4-55 % (v/v)) der analytischen Trennsäule (PepMap Acclaim C18 LC Säule, 25 cm, 3 µm Partikelgröße, Thermo Scientific). Die massenspektrometrische Analyse der chromatographisch aufgetrennten Peptidfraktionen wurde mit einem Quadrupole-Orbitrap Q Exactive HF Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific) in Anlehnung an Starke et al. 2017 mit einer nano-Elektrosprayionisation (ESI) Quelle im LC-Chip-Kopplungsmodus (TriVersa NanoMate, Advion) durchgeführt. Je Zyklus wurde zunächst ein Full-Scan ohne Fragmentierung durchgeführt und dann für MS/MS-Scans datenabhängig ausgewählte Precursor-Ionen durch High Energy Collision Dissociation (HCD) fragmentiert (Loop Count: 15). Die MS-Scans wurden mit einer Auflösung von 120.000 im Scanbereich von 350-1.600 m/z gemessen. Das MS-Ionenzählziel wurde auf  $3 \times 10^6$  bei einer Injektionszeit von 120 ms eingestellt. Die Precursor-Ionen für MS/MS-Scans wurden im Quadrupol mit einem Isolationsfenster von 1,2 m/z isoliert, in der HCD-Zelle mit 28 % Kollisionsenergie fragmentiert und im Orbitrap-Massenanalysator mit einer Auflösung von 30.000 im Bereich von 200-2.000 m/z gemessen. Das Ziel der automatischen Verstärkungskontrolle wurde auf  $2 \times 10^5$  mit einer Injektionszeit von 150 ms eingestellt. Die dynamische Ausschlussdauer wurde auf 45 s mit einer Toleranz von 10 ppm festgelegt. Für die Proteinidentifizierung wurde die Software Proteome Discoverer (v2.5.0. 400, Thermo Scientific) verwendet und die erfassten MS/MS-Spektren wurden mit Sequest HT gegen die proteincodierenden bakteriellen Sequenzen der UniProt-Datenbank (Release 07/2021 für Oligoflexales, Pseudomonas, Blastomonas, Brevundimonas, Devosia, Hydrogenophaga,

Methylophilus, Sphingomonas, Stenotrophomonas, Variovorax), das predicted Proteom von *Paraphelidium tribonemae* (Torruella et al. 2018) und Algenproteome der Alga-PrAS-Ressource (06/2016) gesucht. Als Enzymspezifität wurde Trypsin gewählt, wobei bis zu zwei fehlgeschlagenen Spaltungen erlaubt waren und eine Peptidiontoleranz von 10 ppm und MS/MS-Toleranzen von 0,02 Da verwendet wurden. Als variable Modifikationen wurde die Oxidation an Methionin und als statische Modifikation die Carbamidomethylierung an Zysteinen ausgewählt. Nur Peptide mit einer vom Software-Tool Percolator berechneten Falschentdeckungsrate < 1 % wurden als identifiziert betrachtet. Die identifizierten Proteine wurden nach striktem Parsimonie-Prinzip gruppiert, d. h., es wurde die kleinste Menge von Proteintreffern angegeben, die alle beobachtbaren Peptide enthielt. Die Proteinabundanz wurden mit dem im Proteome Discoverer implementierten Minora-Feature-Detektor berechnet. Taxonomische und funktionelle Annotationen der beobachteten Proteingruppen (PG) wurden mit der Open-Source-Software ProPhane gewonnen, wobei die Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) für taxonomische und die EggNOG Datenbank (v5.0) für funktionelle Annotationen durchsucht wurde. Die Proteinannotationen wurden auf der Grundlage des lowest common ancestor Prinzips von 0,6 pro PG berechnet.

Die in diesem Absatz beschriebenen nanoLC-MS/MS-Messungen und Auswertungen der Proteomdaten wurden aufgrund der nötigen Geräteausstattung und Rechenkapazitäten von Dr. Nico Jehmlich am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung Leipzig durchgeführt.

### 2.2.15 Statistische Analyse der Metaproteomdaten

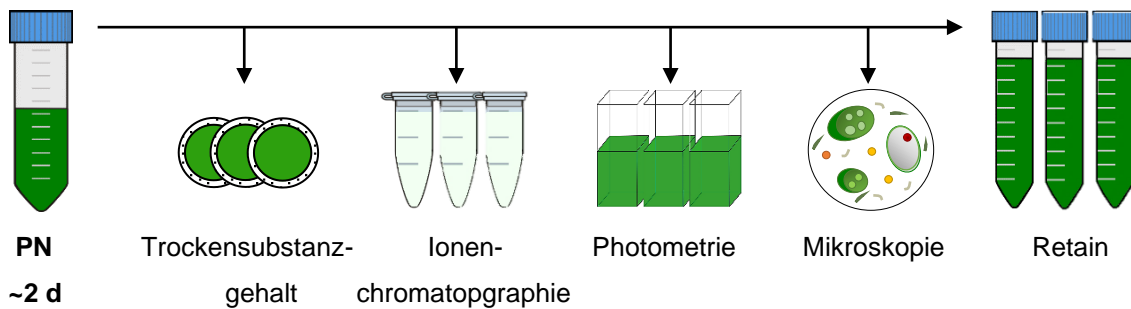
Zur weiteren Analyse wurde der Datensatz anhand der taxonomischen Zuordnung der PGs zu Bakterien und Eukaryonten aufgeteilt. PGs, die weder zu Bakterien noch Eukaryonten zugeordnet werden konnten, wurden von den weiteren Analysen ausgeschlossen. Um die taxonomische Zusammensetzung im Verlauf der Infektion besser beurteilen zu können, wurden außerdem eukaryotische PGs auf Phylum-Ebene weiter in eine Algen- und Pilzgruppe aufgeteilt. PGs die anhand ihrer Mitglieder nicht klar zu einem einzigen Phylum zugeordnet werden konnten, wurden in der letzten Gruppe zusammengefasst, die im Folgenden als "Various" bezeichnet wird. Auf der Grundlage der relativen Häufigkeiten der PGs wurden euklidischen Distanzen mit dem ‚vegan‘ Paket auf der Open-Source-Plattform R (v3.6.1) für eukaryotischen und bakteriellen Datensatz berechnet und mittels NMDS dargestellt (Oksanen et al. 2019). Der Einfluss von Aphelidien-Infektion und Inkubationszeit auf die Proteinverteilung wurde mittels eines PERMANOVA Signifikanztests in vegan berechnet. Zum Vergleich der Abundanz von eukaryotische und bakterielle PGs über die Zeit wurden die Proteinhäufigkeiten  $\log_2$ -transformiert und median normalisiert und in Heatmaps mit dem ‚pheatmap‘-Paket in R visualisiert. Außerdem wurden Unterschiede in der Proteinhäufigkeit

---

zwischen nicht infizierten (NI) und aphelidien-infizierten (AI) Kulturen anhand von  $\text{Log}_2$ -Fold Changes (FCs) mit dem R-Paket ‚limma‘ (Ritchie et al. 2015) berechnet. Die Datenvisualisierung der FCs als Vulkanplots wurde mit ggplot2 (Wickham 2016) realisiert. PGs mit signifikantem ( $p < 0,05$ )  $\text{FC} > 1,5$  oder  $< -1,5$  wurden extrahiert und die Anteile der jeweiligen funktionellen Untergruppen wurden Tortendiagrammen für bakteriellen und eukaryotischen PGs aufgetragen. Funktionelle Beschreibungen, EC-Nummern sowie Pfam-Nummern wurden mit der PHI-Datenbank (Jain et al. 2021; Mehta et al. 2008; Chisholm et al. 2006; Urban et al. 2020) abgeglichen, um Proteine zu finden, die typischerweise mit Pflanzen-Pathogen-Interaktionen in Verbindung gebracht werden.

## 2.3 Experimenteller Aufbau

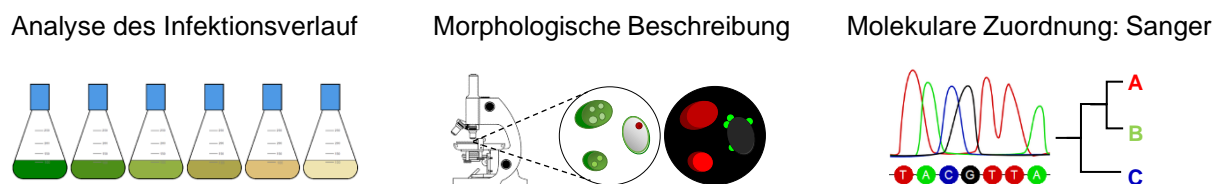
Allen im Folgenden dargestellten Experimenten liegt ein allgemeines Beprobungsschema zugrunde (Abbildung 7). In der Regel werden alle Experimente im zwei Tages Takt beprobet (Probenahmen = PN) und direkt hinsichtlich algenpezifischer Wachstumsparameter (siehe Kapitel 2.2.1) analysiert. Dazu gehört die Bestimmung des Trockensubstanzgehaltes (TS), der optische Dichte ( $OD_{750}$ ) und Chlorophyll *a*-Fluoreszenz ( $E_{685}$ ), sowie der Nährstoffkonzentration im Medium mittels Ionenchromatographie und die mikroskopische Untersuchung der morphologischen Veränderung der Kulturen. Zusätzlich wird eine Rückstellprobe (Retain) genommen und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  für weitere Aufarbeitungen wie DNA-/Protein-Extraktionen aufbewahrt. Auf Abweichungen von diesem standardmäßigen Beprobungsplan wird im Detail in der nachfolgenden Beschreibung hingewiesen.



**Abbildung 7: Übersicht Beprobungsschema**

### 2.3.1 Charakterisierung des Aphelidien-Inokulums

Die Charakterisierung erfolgte zum einen durch eine morphologische Beschreibung des Parasiten und des Infektionsprozesses anhand mikroskopischer Aufnahmen (Abbildung 8). Zum anderen wurde eine molekulare Analyse des Aphelidien-Stammes über PCR-Analysen mit Primern, die Bereiche der 18S, ITS1, 5,8S, ITS2 und 28S Regionen der ribosomalen RNA erfassen, durchgeführt. Die Sequenzen der erhaltenen PCR-Produkte wurden über eine Sanger-Sequenzierung ermittelt und durch einen Abgleich mit der NCBI Datenbank BLASTn und einer phylogenetischen Analyse ausgewertet.



**Abbildung 8: Übersicht über die durchgeführten Arbeitsschritte zur Charakterisierung des Aphelidien-Stammes AI15TR**

Die in Kapitel 2.2.7 und 2.2.8 beschriebenen Methoden zur mikroskopischen und molekularen Identifikation des Aphelidienstammes AI15TR wurden im Rahmen der Masterarbeit von Michael Paper durchgeführt.

### 2.3.2 Wirtsspezifität von *A. protococcarum*

In einem weiteren Vorversuch wurde die Wirtsspezifität von *A. protococcarum* durch Infektionsexperimente mit verschiedenen Mikroalgen spezie untersucht.

Die Wirtsspezifität eines Parasiten beschreibt den durch Co-Evolution entstandenen Grad der Spezialisierung auf ein mögliches Wirtsspektrum, das sich bisweilen auf einzelne Wirtsarten beziehen oder auf eine breite Gruppe von Organismen erstrecken kann. In folgendem Experiment wurde also das potenzielle Spektrum der Algen ermittelt, die unter kontrollierten Bedingungen von der eingesetzten Aphelidien-Art infiziert werden können. Dazu wurden elf für die Biotechnologie interessante Arten ausgewählt, die eine unterschiedlich nahe Verwandtschaft zum bekannten Hauptwirt *S. vacuolatus* aufweisen (Tabelle 10). Neben *S. vacuolatus* wurden drei weitere Mikroalgen spezie aus der Familie Scenedesmaceae eingesetzt: *Tetradesmus wisconsinensis*, *Scenedesmus obliquus* und *Desmodesmus quadricauda*. Darüber hinaus wurden mit *Spongiochloris* sp., *Chlorococcum* sp. und *Haematococcus pluvialis* drei Vertreter aus der Familie Chlamydomonadales ausgewählt. Zudem wurden mit *Chlorella sorokiniana*, *Parachlorella kessleri*, *Stichococcus* sp. und *Botryococcus braunii* Vertreter der Trebouxiophyceae eingesetzt, die innerhalb der Grünalgen nur eine basale verwandtschaftliche Beziehung zu den Chlorophyceae aufweisen, zu denen alle anderen ausgewählten Spezie gehören.

Für den Versuch wurden die elf Arten in Duplikaten in Kulturkolben angezogen und auf eine OD von 0,3 eingestellt. Ein Duplikat jeder Spezie wurde mit 5 ml Aphelidien-Inokulum (5 % v/v) infiziert, während das zweite Duplikat als Negativkontrolle diente. Über die gesamte Versuchsdauer von 19 Tagen wurden alle zwei Tage die TS bestimmt und die Infektion mittels Mikroskopie überprüft (Abbildung 9). Die Pathogenität des Parasitenstammes AI15TR, wurde anhand der eindeutigen morphologischen Veränderungen einer Aphelidien-Infektion beurteilt und die Virulenz wie in Kapitel 2.2.6 beschrieben bestimmt.

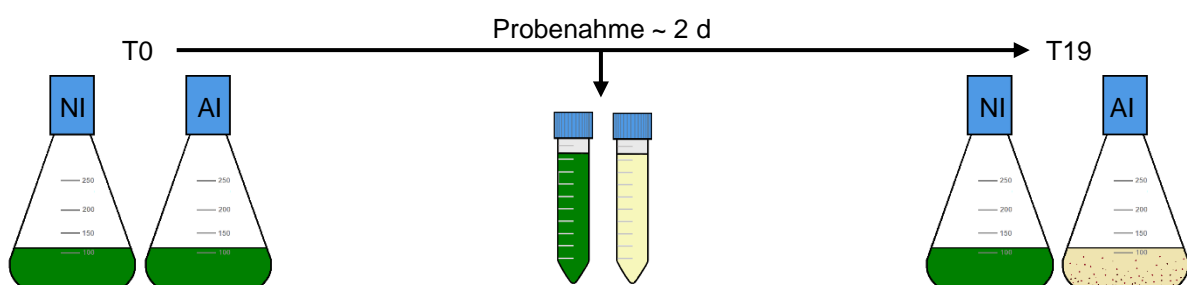


Abbildung 9: Experimenteller Aufbau zur Untersuchung der Wirtsspezifität von AI15TR

### 2.3.3 Kontaminationsexperiment

Um die Auswirkungen einer Aphelidien-Infektion zu untersuchen, wurden vier Mikroalgenspezies mit unterschiedlichen Infektionsverläufen für detailliertere Kontaminationsexperimente ausgewählt. Neben der Wirtsalge *S. vacuolatus* wurden dafür *D. quadricauda*, *C. sorokiniana* und *B. braunii* ausgewählt. Dabei soll unter anderem untersucht werden, ob durch die Kultivierung unter axenischen bzw. unsterilen Kultivierungsumgebung Unterschiede in den jeweiligen Infektionsverläufen auftreten (Abbildung 10).

Die Hälfte der Kulturen jedes Durchlaufes wurde folglich unter sterilen Bedingungen in einer Laminarflowbox vorbereitet, während die andere Hälfte in der offenen Laborumgebung und ohne Desinfizierung gehandhabt wurde. Zum Start der Experimente wurden alle Kulturen auf die gleiche Zelldichte ( $OD_{750} = 0,2$ ) eingestellt. Dann wurden je drei Replikate mit 100ml (6,6 %) Aphelidien-Inokulum infiziert (AI) und drei weitere nicht infizierte Replikate mit 100 ml Reinstwasser versetzt (NI). Die Algenkulturen der vier resultierenden Kultivierungsbedingungen (offen NI, offen AI, steril NI, steril AI) wurden für 21 Tage in 1,5 l Blasensäulen nach Standard-Kultivierungsparametern (siehe Kapitel 2.2.1) in Triplikaten kultiviert. Zur Analyse des Infektionsverlaufs wurden alle Kulturen jeweils nach beschriebenem Standardschema beprobt (Abbildung 7). Zu drei Zeitpunkten – zu Beginn (Tag 0), Mitte (Tag 8) und Ende (Tag 16) des Experimentes – wurde wie beschrieben DNA aus den Rückstellproben aller der Kontaminationsexperimente extrahiert und für eine Amplicon-Sequenzierungen mit spezifischen bakteriellen Primern zur Identifizierung der vorhandenen Bakterien herangezogen.

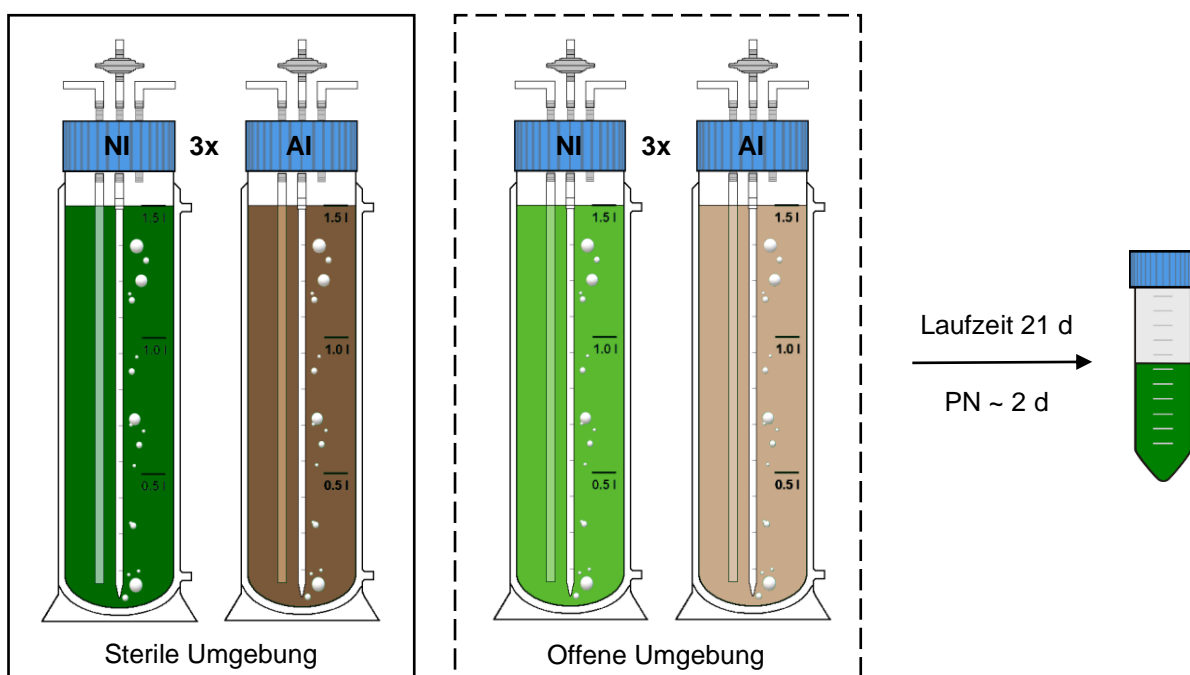


Abbildung 10: Experimenteller Aufbau der Kontaminationsexperimente



### 2.3.4 Proteomexperiment

Um zu untersuchen, inwiefern sich die metabolischen Profile der infizierten Mikroalgen und assoziierten Bakterien über einen Infektionsverlauf im Vergleich zu gesunden Kulturen verändern, wurde ein spezielles Infektionsexperiment zur Ernte von Biomasse aus verschiedenen Wachstums- und Infektionsphasen durchgeführt.

Das Experiment folgte in seinem Aufbau den vorausgegangenen Kontaminationsexperimenten mit *S. vacuolatus*. Die Kulturen wurden zum Start der Experimente auf eine OD von 0,2 eingestellt und die Hälfte mit 100 ml (6,6 %) Aphelidien-Inokulum (AI) infiziert, während die andere Hälfte mit 100 ml Reinstwasser (NI) versetzt wurde und als Kontrollkultur fungierte (Abbildung 11). Die Kulturen wurden für sieben Tage in Blasensäulen nach Standard-Kultivierungsparametern in Triplikaten kultiviert (siehe Kapitel 2.2.1). An drei ausgewählten Zeitpunkten wurde Biomasse für die Proteinextraktion geerntet: Die erste Ernte erfolgte vor der Infektion der Kulturen. Dazu wurden 600 ml Algen-Startkultur herangezogen, um einen gleichen Start aller Kulturen als Referenz festzuhalten. Vier Tage nach der Infektion, als sich erste morphologische Anzeichen einer Aphelidien-Infektion abzeichneten, wurden jeweils 400 ml aus jeder Blasensäule geerntet. Sieben Tage nach der Infektion war die Zerstörung des Großteils der infizierten Algenpopulation abgeschlossen, sodass weitere 400 ml aus allen Blasensäulen geerntet wurden. Die Einengung der Biomassen erfolgte direkt nach der PN per Zentrifugation bei 10.000 g für 5 min. Die konzentrierte Biomasse wurde bis zur Proteinextraktion und weiterer Aufarbeitung bei -80 °C aufbewahrt.

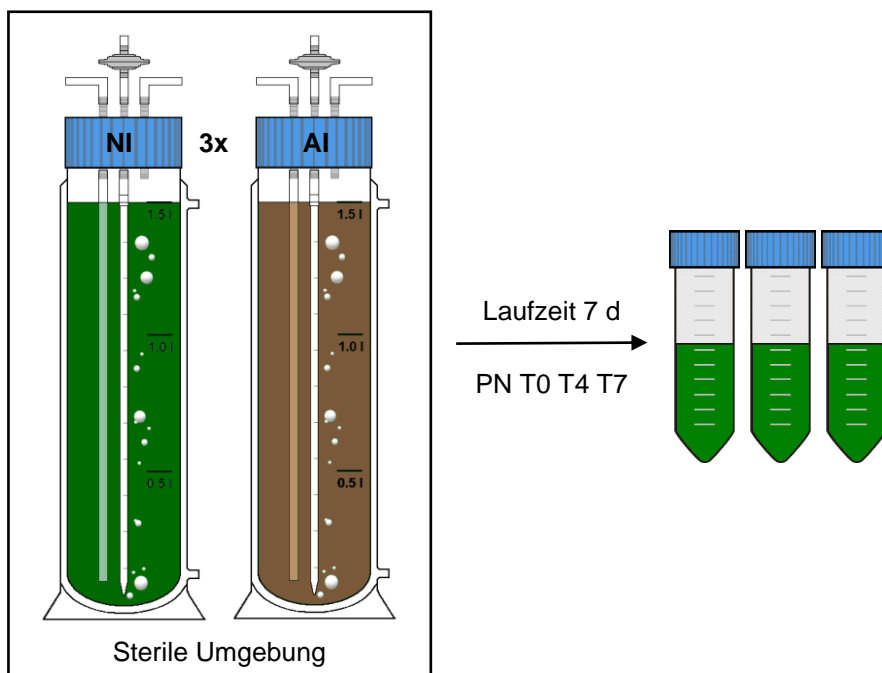
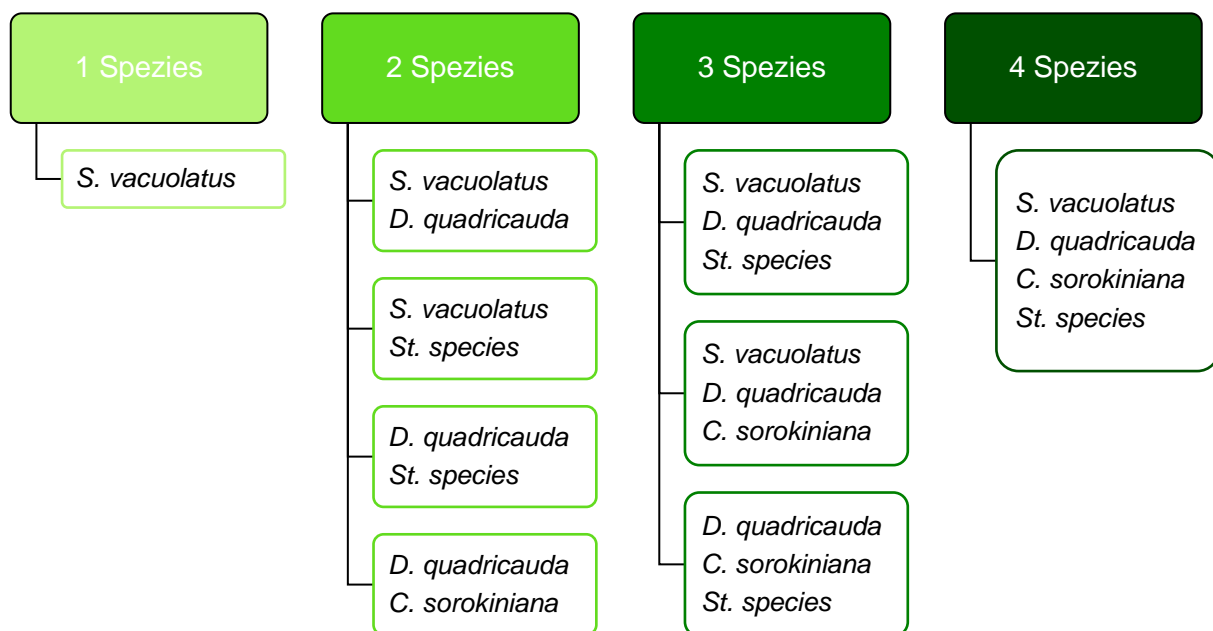


Abbildung 11: Experimenteller Aufbau des Proteomexperimentes

### 2.3.5 Behandlungsexperiment 1: Erhöhung der Algendiversität

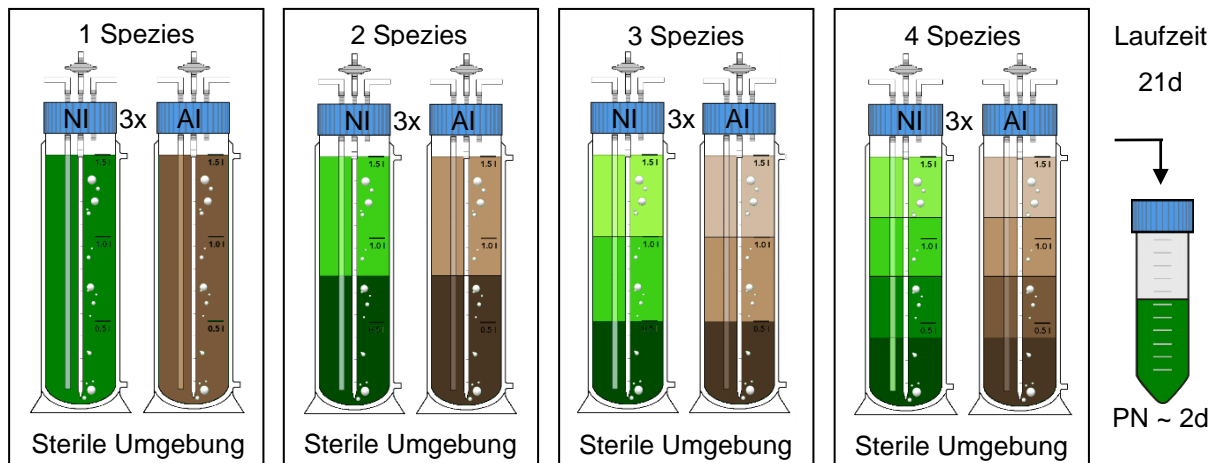
In der Literatur wird von positiven Effekten auf Produktivität, Lipidgehalt, Fraßschutz und Nährstoffnutzung durch Erhöhung der Algendiversität in industriellen Systemen berichtet. In diesem Experimentalblock soll deshalb untersucht werden, ob in Polykulturen verschiedener Diversität und Zusammensetzung nicht nur eine Produktionssteigerung bei gesunden Arten, sondern auch ein erhöhter Schutz gegen Parasiten erzielt werden kann.

Der Ablauf dieses ersten Behandlungsexperimentes folgt dem Vorbild der zuvor beschriebenen Kontaminationsexperimente, um eine möglichst große Vergleichbarkeit der Experimente zwischen Monokulturen und Polykulturen zu ermöglichen. Für die Versuche wurden die Arten *S. vacuolatus*, *S. quadricauda* und *C. sorokiniana* ausgewählt, die auch schon beim Kontaminationsexperiment eingesetzt wurden. Da die Morphologie von *B. braunii* – als Beispiel für eine gegenüber Aphelidien resistente Art – eine direkte Zellzahlbestimmung nicht zulässt, wurde stattdessen *Stichococcus sp.* für die Diversitätsexperimente ausgewählt. Die Diversitätsexperimente werden in verschiedenen Kombinationen und Diversitätsstufen mit insgesamt neun Variationen durchgeführt (Abbildung 12). Dabei sollen zum Startzeitpunkt alle Arten zu gleichen Anteilen hinsichtlich der Zelldichte vorliegen.



**Abbildung 12: Schematische Übersicht über mögliche Spezieskombinationen zur Bildung von Mikroalgenpolykulturen in verschiedenen Diversitätsstufen**

Alle Spezieskombinationen wurden jeweils als NI und AI-Kulturen in biologischen Duplikaten über eine Versuchsdauer von 21 Tagen (Abbildung 12) mit Standardparametern kultiviert (Kapitel 2.2.1). Die PN erfolgte nach Standard Beprobungsplan (Abbildung 7). Zusätzlich wurde Zellzahl der beteiligten Spezies in gesunden und infizierten Kulturen ermittelt.



**Abbildung 13: Experimenteller Aufbau der Diversitätsexperimente**

### 2.3.6 Behandlungsexperiment 2: Änderung der abiotischen Kultivierungsparameter

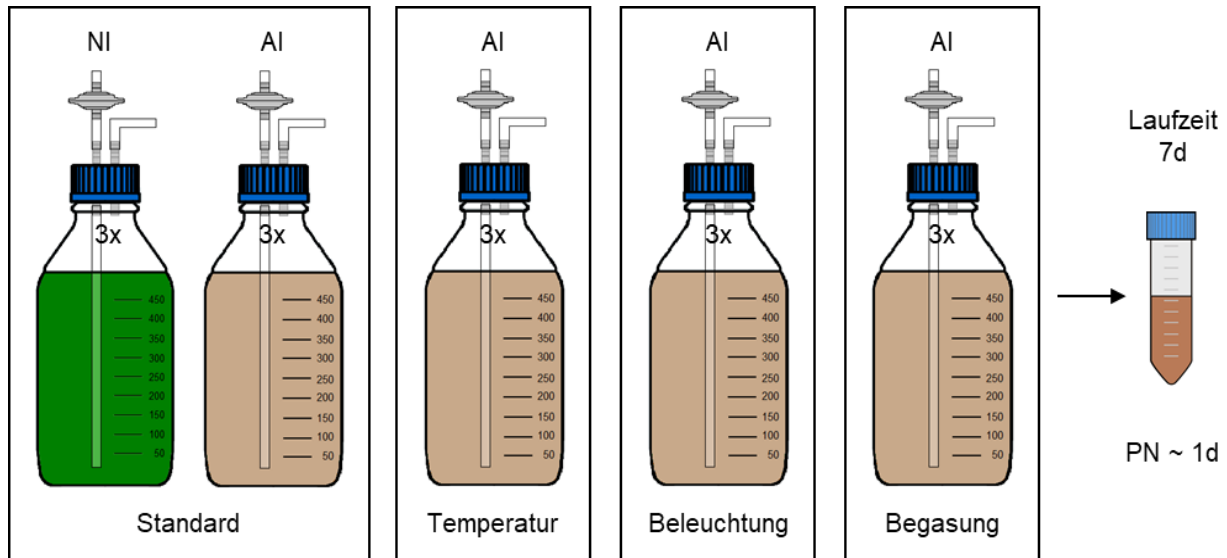
Der Virulenz von Aphelidien wird zu einem Großteil von der Verfügbarkeit und Pathogenität des Wirtes bestimmt, darüber hinaus beeinflussen auch abiotische Faktoren aus der Umwelt den Ablauf der Infektion. Dazu gehören bei der technischen Kultivierung von Mikroalgen verschiedene prozessimmanente Einflussfaktoren, die das optimale Wachstum der Algen sicherstellen sollen. Im zweiten Behandlungsexperiment wurden deshalb Belichtungszeiten, Kultivierungsmedien, Temperatur sowie das Begasungsregime im Vergleich zu den Standard-Kultivierungsparametern variiert (Tabelle 14).

**Tabelle 14: Übersicht über verwendete Kultivierungsparameter im zweiten Behandlungsexperiment**

Behandlung	Belichtung	Temperatur	Begasung	Medium
Standard	24 h 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	23,5 °C	24 h: 1 % CO <sub>2</sub>	BBM, BG11, Setlik
Temperatur	24 h 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	30 °C	24 h: 1 % CO <sub>2</sub>	BBM, BG11, Setlik
Beleuchtung	14 h 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	23,5 °C	24 h: 1 % CO <sub>2</sub>	BBM, BG11, Setlik
Begasung	14 h 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	23,5 °C	14 h: 1 % CO <sub>2</sub> + 10 h 100 % CO <sub>2</sub>	BBM, BG11, Setlik

Zum Start der Experimente wurden alle Kulturen auf eine OD<sub>750</sub> von 0,1 am Infinite Mikroplattenreader (Tecan, Männedorf, CHE) eingestellt. Dann wurden jeweils drei Replikate mit 25 ml (5 %) Aphelidien-Inokulum (AI) infiziert. Außer für die Standardbehandlung wurden keine NI-Kulturen mitgeführt, da lediglich der Einfluss auf den Infektionsverlauf untersucht werden sollte.

Alle Variationen der Kultivierungsregimes wurden mit den Medien BBM, BG11 und Setlik in begasten 500 ml Kultivierungsflaschen in einem Innova Schüttler (New Brunswick Scientific) kultiviert (Abbildung 14). Wenn nicht anders in Tabelle 11 angegeben, wurden die Standard-Kultivierungsparameter (Kapitel 2.2.1) genutzt. Jede Kultur wurde über einen Zeitraum von sieben Tagen täglich hinsichtlich der  $OD_{750}$  und  $E_{685}$  am Mikroplattenreader beprobt.



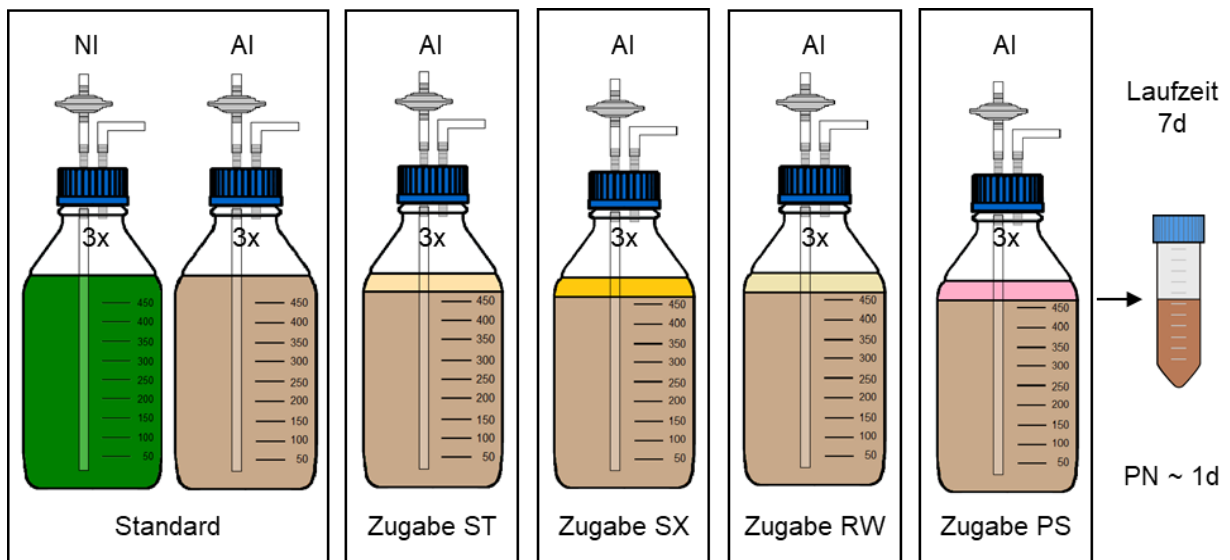
**Abbildung 14: Aufbau zweites Behandlungsexperimentes zur Variation der Kultivierungsparameter**

### 2.3.7 Behandlungsexperiment 3: Co-Kultivierung mit protektiven Bakterien

Zusätzlich sollte der Einfluss spezifischer Bakterien des Begleitmikrobioms auf das Infektionsgeschehen untersucht werden. Dazu wurden Bakterien mittels Verdünnungsausstrichen auf R2A Agar-Platten aus nicht-axenischen *S.vauolatus*-Kulturen isoliert und mittels Sanger-Sequenzierung identifiziert (LGC Genomics, Berlin, DE). Anhand der Literatur wurden die drei Bakterienstämme *Sphingopyxis terrae* (ST), *Pseudoxanthomonas* sp. (SX) und *Rhizobium wuzhouense* (RW) mit potenziell protektiven Eigenschaften für die Co-Kultivierung ausgewählt. Zusätzlich wurde *Pseudomonas protegens* (PS) Stamm CHA0 (DSM 19095) als bekanntes PGPB für die Co-Kultivierung ausgewählt.

Zum Start der Experimente wurden alle Algen-Startkulturen auf eine  $OD_{750}$  von 0,1 am Ininite Mikroplattenreader (Tecan, Männedorf, CHE) eingestellt. Dann wurden jeweils drei Replikate für jede Behandlung mit 25 ml (5 %) Aphelidien-Inokulum (AI) infiziert. Außer für die Standardbehandlung wurden keine nicht infizierten Kontrollkulturen (NI) mitgeführt.

Das Bakterien-Inokulum wurde drei Tage auf flüssigem R2A Medium in sterilen Schüttelflaschen angezogen und jeweils in Endkonzentration von  $10^7$  Zellen/l zu den Algenkulturen zugegeben (Abbildung 15). Die Co-Kulturen wurden dann unter Standardbedingungen für sieben Tage mit modifiziertem BBM Medium mit je drei biologischen Replikaten kultiviert. Um für eine ausreichende Versorgung der Bakterien mit Nährstoffen zu sorgen, wurde das Natriumnitrat im BBM Medium durch äquivalent Ammoniumacetat ersetzt. Jede Co-Kultur wurde täglich hinsichtlich der  $OD_{750}$  und  $E_{685}$  am Mikroplattenreader analysiert.



**Abbildung 15: Aufbau des dritten Behandlungsexperiment zur Co-Kultivierung mit protektiven Bakterien**

Die Experimente zur Behandlung von Aphelidien-Infektionen durch die Änderung von abiotischen Kultivierungsparameter (2.3.6) und Co-Kultivierung mit protektiven Bakterien (2.3.7) wurden im Rahmen eines kooperativen Forschungsvorhabens in Zusammenarbeit mit der GICON®-Großmann Ingenieur Consult GmbH durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

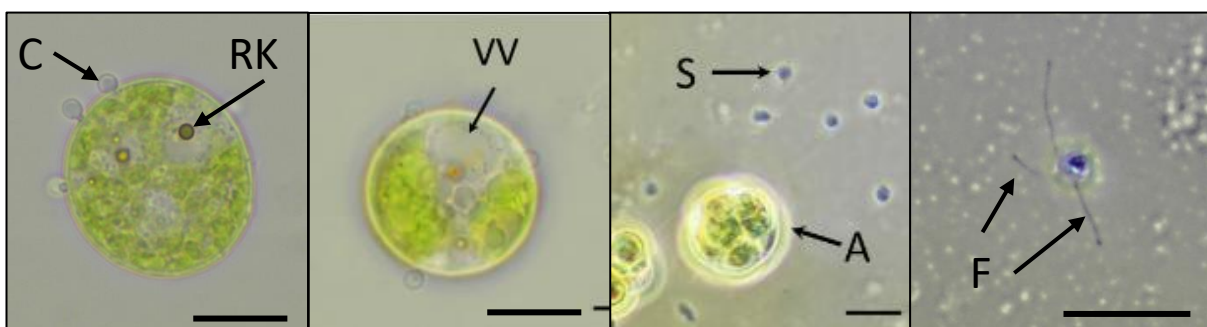
Im nachfolgenden Kapitel sind die Ergebnisse zu den in Kapitel 2.3 beschriebenen Experimenten dargestellt.

#### 3.1 Charakterisierung des parasitischen Aphelidien-Stammes AI15TR

Zur Feststellung der genauen taxonomischen Zuordnung des Aphelidien-Stammes AI15TR wurde eine morphologische sowie molekularbiologische Charakterisierung der Algenparasiten vorgenommen. Darüber hinaus wurde das stammspezifische Wirtsspektrum von AI15TR mittels Infektionsscreening anhand von elf Grünalgenarten untersucht.

##### 3.1.1 Mikroskopische Beobachtungen des Aphelidien-Stammes AI15TR

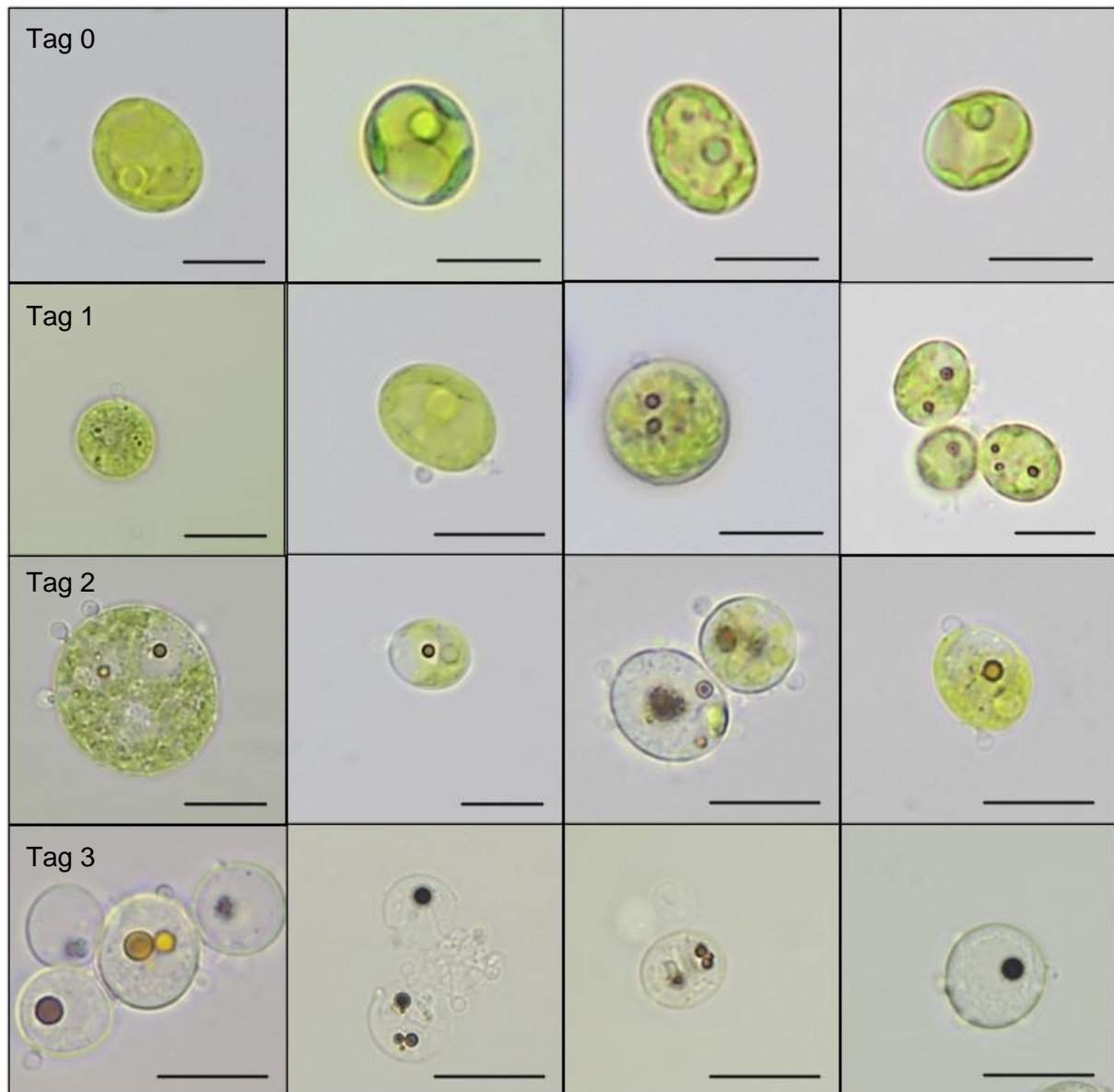
Bei der mikroskopischen Beobachtung der infizierten *S. vacuolatus*-Kulturen konnten verschiedene Strukturen beobachtet werden, die typischerweise bei einer Aphelidien-Infektion auftreten (Kapitel 1.3.1). In den mikroskopischen Hellfeld-Aufnahmen wurden auf den Algenzellen (A) aufsitzende Cysten (C), Verdauungsvakuolen (VV) mit Residualkörpern (RK), sowie amoeboiden Sporen (S) mit mehreren Filopodien (F) beobachtet (Abbildung 16) (Paper 2019). Für die taxonomische Einordnung der Familie Aphelidiaceae werden vornehmlich die Ultrastrukturen der Zoosporen herangezogen, da diese einige zur Unterscheidung geeignete Unterschiede aufweisen (Letcher und Powell 2019). Bei den Sporen von AI15TR wurden die typischen Eigenschaften von Sporen der Gattung *Amoebophilidium* beobachtet (Pinevich et al. 1997; Letcher et al. 2015). Die Sporen wiesen eine Größe von ca. 2-3  $\mu\text{m}$  mit einer unregelmäßigen Form auf und bewegten sich mit Hilfe mehrerer Filopodien amöboid fort (Paper 2019).



**Abbildung 16: Morphologische Merkmale von AI15TR in *S. vacuolatus*-Kulturen**

Aphelidientypische Strukturen: C: Aphelidien-Zyste, RK: Residualkörper, VV: Verdauungsvacuole, S: Aphelidien-Spore, A: Algenzelle, F: Filopodien, Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ , Aufnahmen: Michael Paper

Ein Infektionszyklus des Aphelidien-Stammes AI15TR läuft in *S. vacuolatus*-Zellen im Schnitt innerhalb von drei bis fünf Tagen ab. Der Infektionsverlauf, sowie alle typischen morphologischen Strukturen stimmen mit dem in der Einleitung beschriebenen Lebenszyklus von *Amoebophilidium protococcarum* überein (Abbildung 17) (Paper 2019).



**Abbildung 17: Exemplarischer Infektionsverlauf von AI15TR in *S. vacuolatus*-Kulturen**

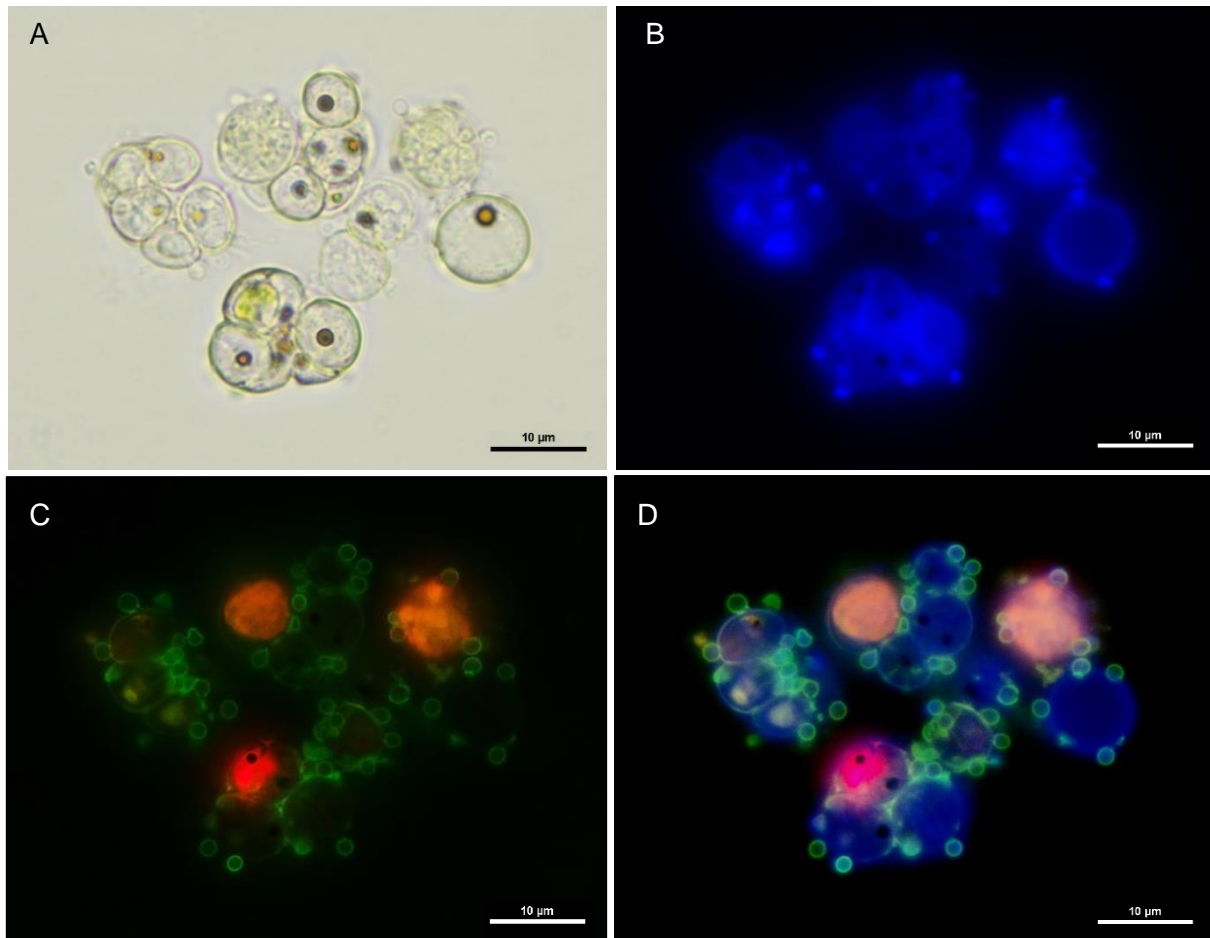
Tag 0: nicht infizierte Algenzellen, Tag 1 - 3: infizierte Algenzellen nach einem bis drei Tagen, Maßstab: 10 µm, Aufnahmen: Michael Paper

Nach der Anheftung der Sporen an die Algenzellen bildeten sich runde Zysten mit ca. 2 µm Durchmesser an der Zelloberfläche aus. In der Regel wurde eine Algenzelle von mehreren Sporen gleichzeitig infiziert. Ausgehend von der Zyste bildete der Parasit eine Infektionsröhre mit einer Länge von ca. 3 - 5 µm aus, über die der Inhalt der Zyste in die Wirtszelle injiziert

wurde. Im Verlauf der Infektion entwickelte sich eine größer werdende Verdauungsvakuole, die durch eine Entfärbung der Algenzelle sichtbar wurde. Mit fortschreitender Infektion trat eine vollständige Entfärbung der Algenzellen ein. Des Weiteren konnte sehr früh nach der ersten Ausbildung von Zysten auch die Entstehung eines, in seltenen Fällen mehrerer, Residualkörper innerhalb der Verdauungsvakuole beobachtet werden. Die amöboiden Aphelidien-Sporen traten meist periodisch auf.

Da eine beginnende Infektion mit Aphelidien in Hellfeld-Aufnahmen mit einem Lichtmikroskop schwer zu erkennen ist, wurde in Zusammenarbeit mit Michael Paper im Rahmen seiner Masterarbeit eine Färbemethode mit Weizenkeim-Agglutinin mit Fluorescein-Konjugat (WGA-FITC) etabliert, die es ermöglicht infizierte Algenzellen anhand des in den Aphelidien-Zysten enthaltenen Chitins spezifisch und frühzeitig zu detektieren (Kapitel 2.2.5) (Paper 2019). Mit WGA gefärbte Zysten erscheinen bei der genutzten Anregungswellenlänge von ca. 460 - 490 nm grün unter dem Fluoreszenzmikroskop, während das Chlorophyll durch Autofluoreszenz in den Algenzellen gleichzeitig rot fluoresziert. Auf mikroskopischen Aufnahmen, die mit dieser Methode aufgenommen wurden, waren die Aphelidien-Zysten auf der Oberfläche befallener Algenzellen gut zu erkennen (Abbildung 18). Außerdem kann der Abbau des Chlorophylls in den Algenzellen mit fortschreitendem Infektionsverlauf anhand des Rückgangs der roten Fluoreszenz beobachtet werden. Aphelidien-Sporen konnten mit dieser Methode nicht angefärbt werden, da diese keine Zellwand aus Chitin besitzen. Eine Kombination der Färbemethode mit weiteren Fluoreszenzfarbstoffen, wie beispielsweise DAPI, das zur Detektion weiterer unspezifischer Kontaminationen eingesetzt werden kann, ist möglich. Durch eine Überlagerung der fluoreszenz-mikroskopischen Aufnahmen bei verschiedenen Anregungswellenlängen können Bilder erzeugt werden, die die Infektion durch Aphelidien deutlich besser sichtbar machen als herkömmliche Hellfeld-Aufnahmen (Abbildung 18).





**Abbildung 18: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer mit Aphelidien-Stamm AI15TR infizierten *S. vacuolatus*-Kultur**

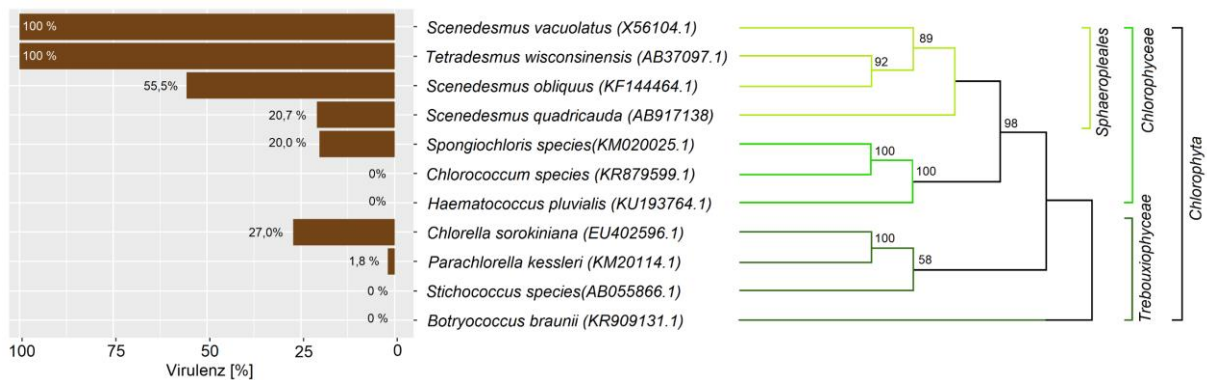
Mikroskopische Aufnahmen im Hellfeld (A) und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mit DAPI Färbung (B) und WGA-FITC (C), sowie kombiniertes Bild der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (D); Maßstab: 10 µm, Aufnahmen: Michael Paper

### 3.1.2 Molekularbiologische Charakterisierung des Aphelidien-Stammes AI15TR

Zur molekularbiologischen Charakterisierung des Aphelidien-Stammes AI15TR wurden die rRNA Gene der 18S, ITS1, 5,8S, und ITS2 -Region sequenziert. Die vollständigen Sequenzen sind im Anhang aufgeführt (Kapitel 7.1.2) (Paper 2019). Ein Abgleich mit der NCBI Datenbank BLASTn erzielte für die DNA-Sequenz beider Genabschnitte jeweils eine Abdeckung von 100 % und einer Sequenzidentität von 100 % bzw. 99 % mit Sequenzen der Spezies *Amoebophilidium protococcarum* (JX507298.1). Anhand einer phylogenetischen Verwandtschaftsanalyse der 18S Gen-Sequenz von AI15TR und weiteren 13 Aphelidien-Sequenzen konnte die Zuordnung zu *A. protococcarum* bestätigt werden (Abbildung A1). Basierend auf diesen Ergebnissen wird der bis dato unbekannte Aphelidien-Stamm AI15TR im Folgenden als *Amoebophilidium protococcarum* AI15TR bezeichnet.

### 3.1.3 Analyse des Algen-Wirtsspektrums von *A. protococcarum* AI15TR

Der Screeningversuch zum Algen-Wirtsspektrum *A. protococcarum* AI15TR ergab, dass dieser Stamm für Vertreter der Ordnung Sphaeropleales (Familie Scenedesmaceae) *S. vacuolatus*, *T. wisconsinensis*, *S. obliquus* und *D. quadricauda*, pathogen war, wenn auch mit unterschiedlich ausgeprägter Virulenz (Abbildung 19). Dagegen erlitten Vertreter anderer Ordnungen innerhalb der Klasse der Chlorophyceae wie *H. pluvialis*, *Chlorococcum* sp. und *Spongiochloris* sp. durch die Zugabe von *A. protococcarum* AI15TR kaum Wachstumseinbußen im Vergleich zu nicht infizierten Kulturen. Mikroskopisch konnten keine Anzeichen einer Aphelidien-Infektion an den Algenzellen entdeckt werden. Auch für Vertreter der phylogenetisch weiter entfernt verwandten Ordnung Chlorellales (Klasse Trebouxiophyceae), *C. sorokiniana* und *P. kessleri*, wurden nur geringe Virulenzen gegenüber der Aphelidien-Infektion festgestellt. Gegenüber *Stichococcus* sp. und *Botryococcus braunii* als Vertreter weiterer Ordnungen der Trebouxiophyceae wurde keine Pathogenität von AI15TR beobachtet. Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass mit wachsender phylogenetischer Distanz zur Wirtsalge *S. vacuolatus* die Virulenz gegenüber der Infektion mit *A. protococcarum* AI15TR sinkt (Abbildung 19).



**Abbildung 19: Analyse des Algen-Wirtsspektrums von *A. protococcarum* AI15TR**

Darstellung der Virulenz ( $V_{TS}$ ) von elf infizierten Mikroalgenkulturen aus der Gruppe der Chlorophyta und der verwandtschaftlichen Verhältnisse der ausgewählten Algen basierend auf der Maximum-Likelihood Methode nach dem Tamura-Nei Model. Die NCBI-IDs sind in Klammern angegeben, die Zahlen an den Abzweigungen geben den Bootstrap-Wert an.

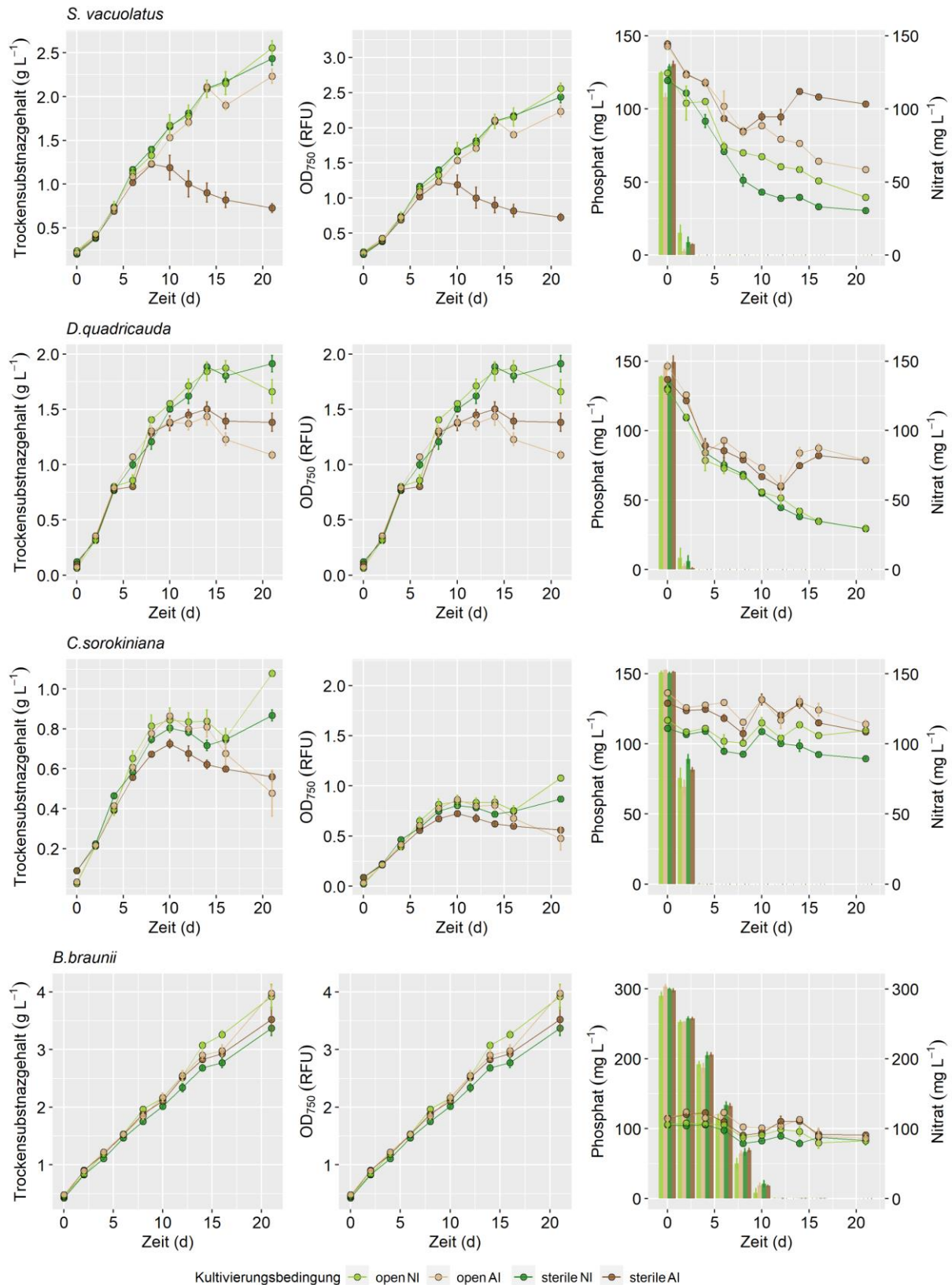
### 3.2 Infektionsverlauf in Mikroalgenkulturen

Die Effekte der Infektion mit *Amoebophilidium protococcarum* AITR15 wurden anhand des Algenwachstums von infizierten und gesunden Kulturen der Mikroalgenstämme *S. vacuolatus*, *D. quadricauda*, *C. sorokiniana* und *B. braunii* unter sterilen Laborbedingungen (steril) und unter simulierten industriellen Bedingungen (offen) untersucht.

#### 3.2.1 Untersuchung des Infektionsverlaufes bei verschiedenen Algenspezies in offener und steriler Kultivierungsumgebung

Um die Auswirkungen der Infektion mit *A. protococcarum* AITR15 zu charakterisieren, wurde das Algenwachstum anhand der Bestimmung von Trockensubstanzgehalt (TS), optischer Dichte ( $OD_{750}$ ) und des Nährstoffverbrauches mittels Ionenchromatographie (IC) (Abbildung 20), sowie mittels mikroskopischer Beobachtung des morphologischen Zustandes (Abbildung 21) der vier ausgewählten Mikroalgenstämme in den vier Kultivierungsbedingungen (steril AI, offen AI, steril NI, offen NI) genauer untersucht. Die NI Kulturen aller getesteten Algenspezies wiesen eine steigende TS, OD sowie Nährstoffverbrauch (Nitrat und Phosphat) über die Versuchsdauer von 21 Tagen auf. Die Betrachtung der Entwicklung der Wachstumsparameter von AI Algenkulturen ließ deutliche Unterschiede zwischen den ausgewählten Spezies erkennen (Abbildung 20). Für den optimalen Wirtsorganismus *S. vacuolatus* konnte der früheste und deutlichste Einbruch ( $p=0.001^*$ ) im Algen-Wachstum einer infizierten Kultur verzeichnet werden (Tabelle 15). Auch bei den nah verwandten Arten *C. sorokiniana* und *D. quadricauda* wurde ein deutlicher Rückgang des Wachstums für die mit Aphelidien infizierten Kulturen im Vergleich mit den nicht infizierten Kulturen verzeichnet. Für die Mikroalge *B. braunii* wurde während der Versuchsdauer kein Einbruch im Wachstum der verschiedenen Ansätze beobachtet. Vergleicht man den Verlauf der Infektion in offener und steriler Umgebung lag nur bei *S. vacuolatus* eine statistisch signifikante Abweichung vor (Tabelle 15). Hier war nur in sterilen Kulturen ein Rückgang der TS-Gehalte zu verzeichnen, während bei den offenen Kulturen keine Zeichen einer Infektion zu beobachten waren (Abbildung 20). Der Verlauf der Infektion bezüglich der TS stimmte für alle Kulturen sowohl mit den Bestimmungen der  $OD_{750}$  und dem Nährstoffverbrauch von Phosphat und Nitrat aus dem Medium überein.

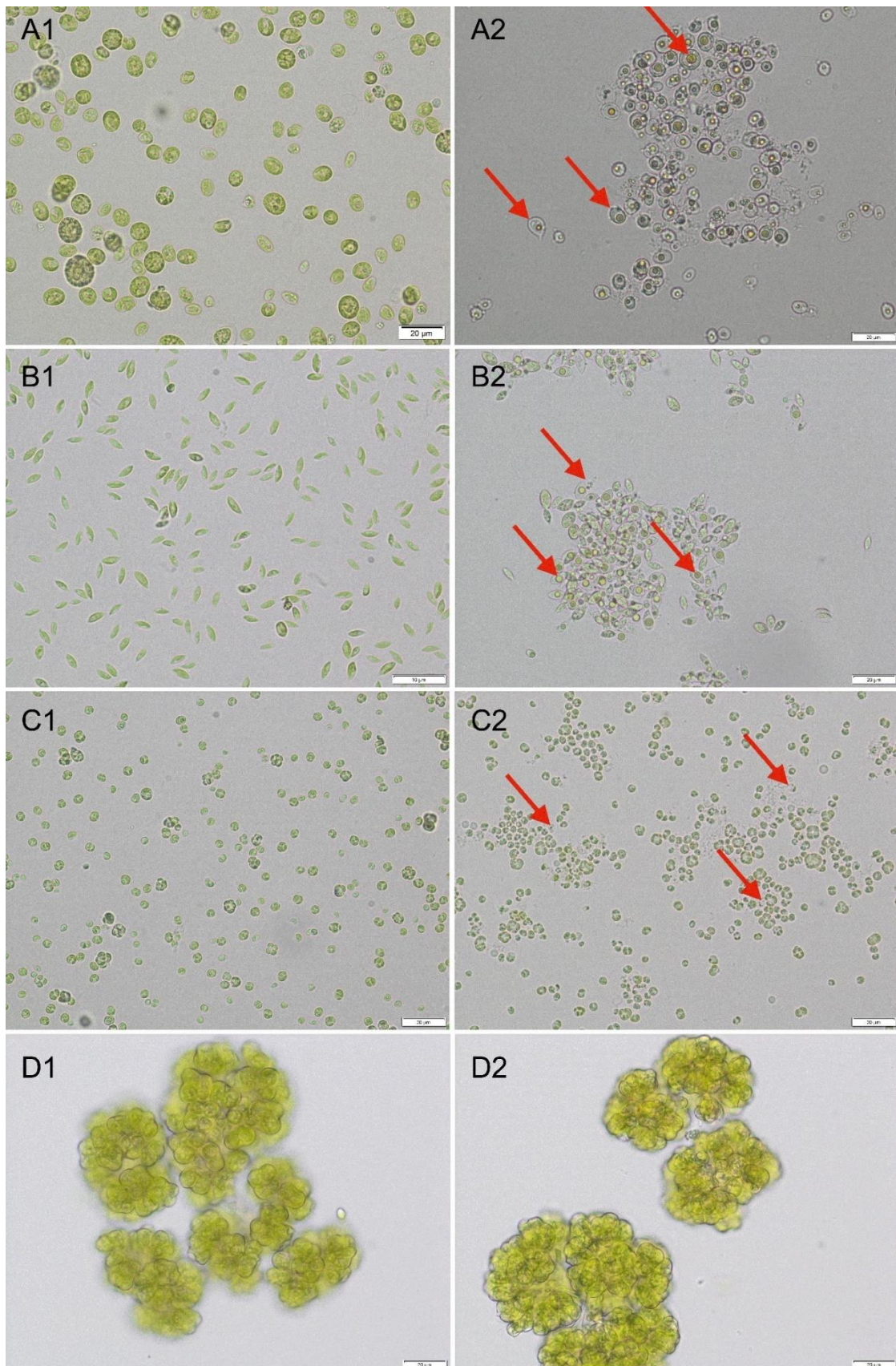
Morphologische Veränderungen der Algenzellen, die bei einer Infektion durch *A. protococcarum* nach der Beschreibung von Letcher *et al.* (2013) typischerweise auftreten - aufsitzende Cysten und Verdauungsvakuolen mit Residualkörper - konnten bei infizierten *S. vacuolatus*, *D. quadricauda* und *C. sorokiniana*- Kulturen aber nicht bei *B. braunii* beobachtet werden (Abbildung 21).



**Abbildung 20: Verlauf von Trockensubstanzgehalt, optischer Dichte ( $OD_{750}$ ) und Nährstoffkonzentration von *S. vacuolatus*-, *D. quadricauda*-, *C. sorokiniana*- und *B. braunii*-Kulturen**

Vergleich von infizierten (AI in braun) und nicht infizierten Kulturen (NI in grün) jeweils in offenen und geschlossenen Kultivierungsbedingungen über den Verlauf von 21 Tagen.





**Abbildung 21: Mikroskopische Aufnahmen von nicht infizierten (1) und aphelidien-infizierten (2) Algenkulturen**

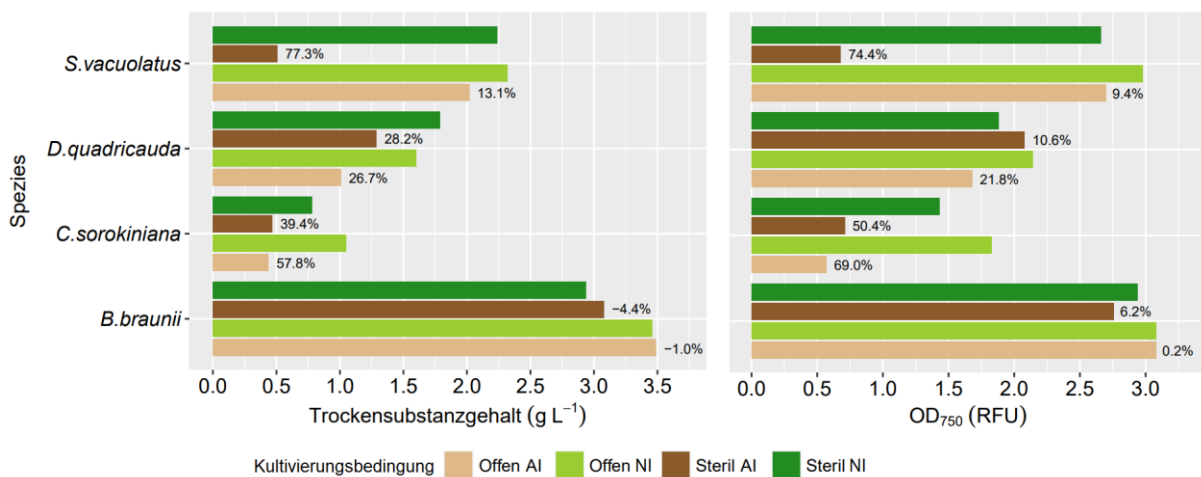
*S. vacuolatus* (A), *D. quadricauda* (2), *C. sorokiniana* (3) und *B. braunii* (4). Maßstab: 20 µm

**Tabelle 15: Varianzanalyse der täglichen TS-Produktivität, OD-Zuwachses, sowie Nitrat und Phosphat Verbrauches von *S. vacuolatus*, *D. quadricauda*, *C. sorokiniana* und *B. braunii* Kulturen**

Signifikante Unterschiede zwischen den vier Kultivierungsbedingungen ( $p < 0.05$ ) sind fett gedruckt und mit \*Sternchen gekennzeichnet.

Spezies	TS-Produktivität		OD-Zuwachs		Nitrat-Verbrauch		Phosphat-Verbrauch	
	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert
<i>S. vacuolatus</i>	5964	<b>0.001*</b>	3819	<b>0.012*</b>	0.075	0.973	0.345	0.793
<i>D. quadricauda</i>	0.431	0.731	1192	0.316	0.006	0.999	0.831	0.480
<i>C. sorokiniana</i>	0.679	0.567	0.644	0.588	0.000	1.000	0.032	0.992
<i>B. braunii</i>	0.810	0.491	0.692	0.559	0.016	0.997	0.028	0.994

Um das Ausmaß der Schädigung abzuleiten, die durch die Infektion in den verschiedenen Mikroalgenkulturen innerhalb von 21 Tagen verursacht wird, wurde die Virulenz von *A. protocoocarum* AI15TR für die unterschiedlichen Spezies und Kultivierungsbedingungen berechnet (Abbildung 22). Hier bestätigt sich, dass sowohl  $V_{TS}$  als auch  $V_{750}$  von *A. protocoocarum* AI15TR in steril gehandhabten *S. vacuolatus* Kulturen am stärksten ausfielen, gefolgt von *C. sorokiniana* und *D. quadricauda*. Da AI15TR für *B. braunii* apathogen ist, wurde hier keine nennenswerte Virulenz festgestellt.



**Abbildung 22: Darstellung des Zuwachses der Trockensubstanz und optischen Dichte ( $OD_{750}$ ) über 21 Tage bei *S. vacuolatus*, *D. quadricauda*, *C. sorokiniana* und *B. braunii*-Kulturen**

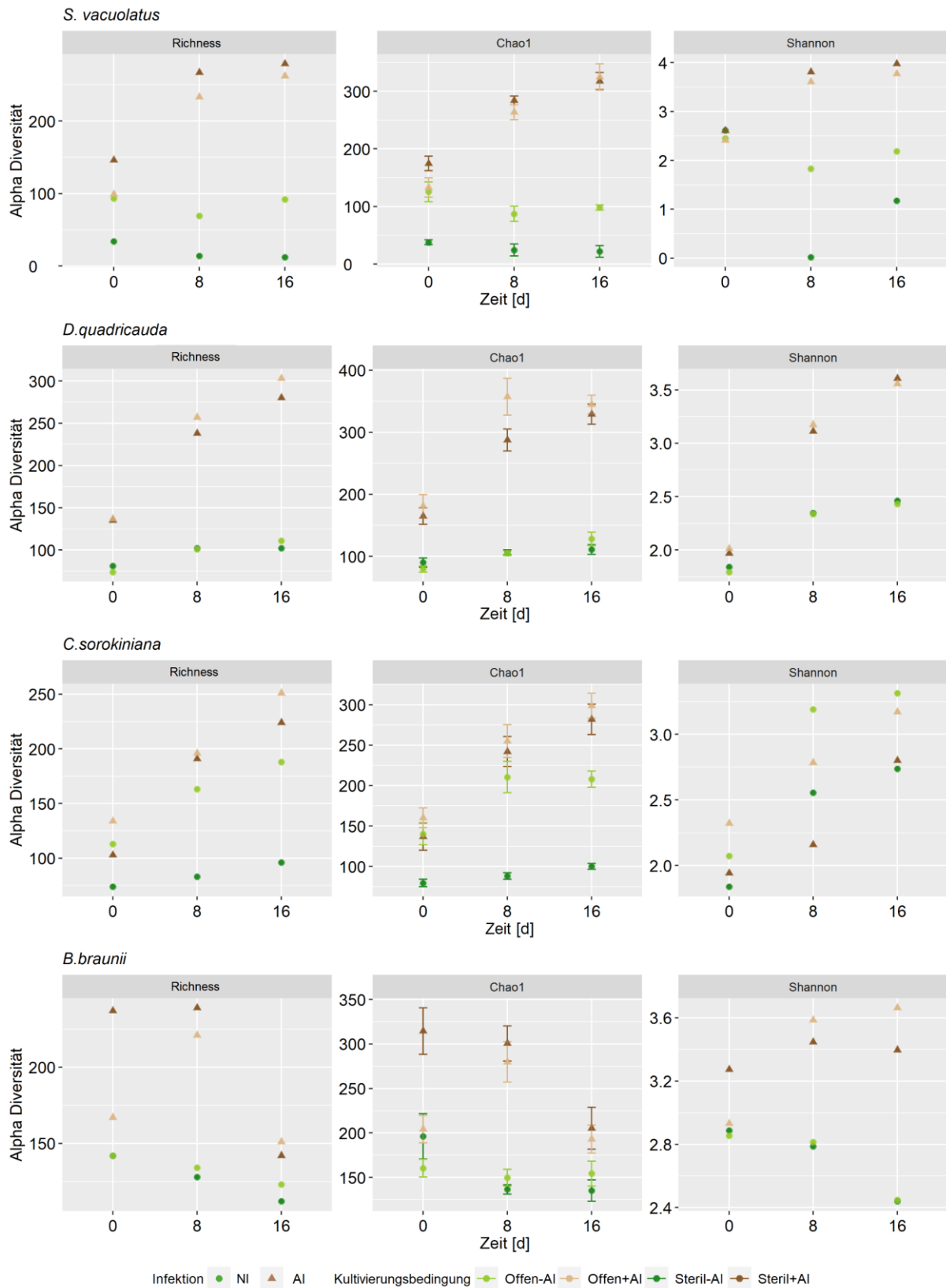
Es wurden infizierte (AI in braun) und nicht infizierte Kulturen (NI in grün) jeweils in offenen und geschlossenen Kultivierungsumgebung betrachtet. Die prozentualen Angaben kennzeichnen die berechnete Virulenz ( $V_{TS}$  und  $V_{750}$ ) von *A. protocoocarum* AI15TR.

### 3.3 Mikrobielle Gemeinschaft in infizierten Mikroalgenkulturen

Während der Kontaminationsexperimente mit *S. vacuolatus*, *D. quadricauda*, *C. sorokiniana* und *B. braunii* wurden nach einer Inkubation von 0, 8 und 16 Tagen Proben zur Untersuchung der bakteriellen Gemeinschaft entnommen und mittels Amplicon Sequenzierung analysiert.

#### 3.3.1 Diversität der bakteriellen Mikroalgen-Gemeinschaft

Die Artenvielfalt und  $\alpha$ -Diversität der bakteriellen Gemeinschaft bieten einen ersten Einblick in die Mikrobiome der vier Algenspezies in Abhängigkeit der vier Kultivierungsbedingungen, die künstlichen Habitate mit verschiedenen Umweltbedingungen entsprechen. Unabhängig von der Algenspezies konnten mehrere generelle Trends identifiziert werden (Abbildung 23): Zunächst ist zu beobachten, dass Artenvielfalt (Richness) und Diversität (Shannon und Chao1) in infizierten Kulturen (AI) im Versuchsverlauf kontinuierlich anstiegen. Außerdem wiesen infizierte Kulturen generell eine höhere Diversität auf als nicht infizierte Kulturen (NI). Die Unterschiede zwischen offenen und sterilen Kulturen dagegen waren vor allem bei infizierten Proben geringer. Es war kein übergreifender Trend zu erkennen, der dafürspricht, dass die steril behandelten Proben deutlich weniger bakterielle Spezies aufweisen. Während in nicht infizierten *S. vacuolatus* und *C. sorokiniana* Kulturen in steriler Umgebung die Diversität niedriger ausfällt, ist bei *D. quadricauda* and *B. braunii* kein Einfluss der Kultivierungsumgebung zu beobachten.

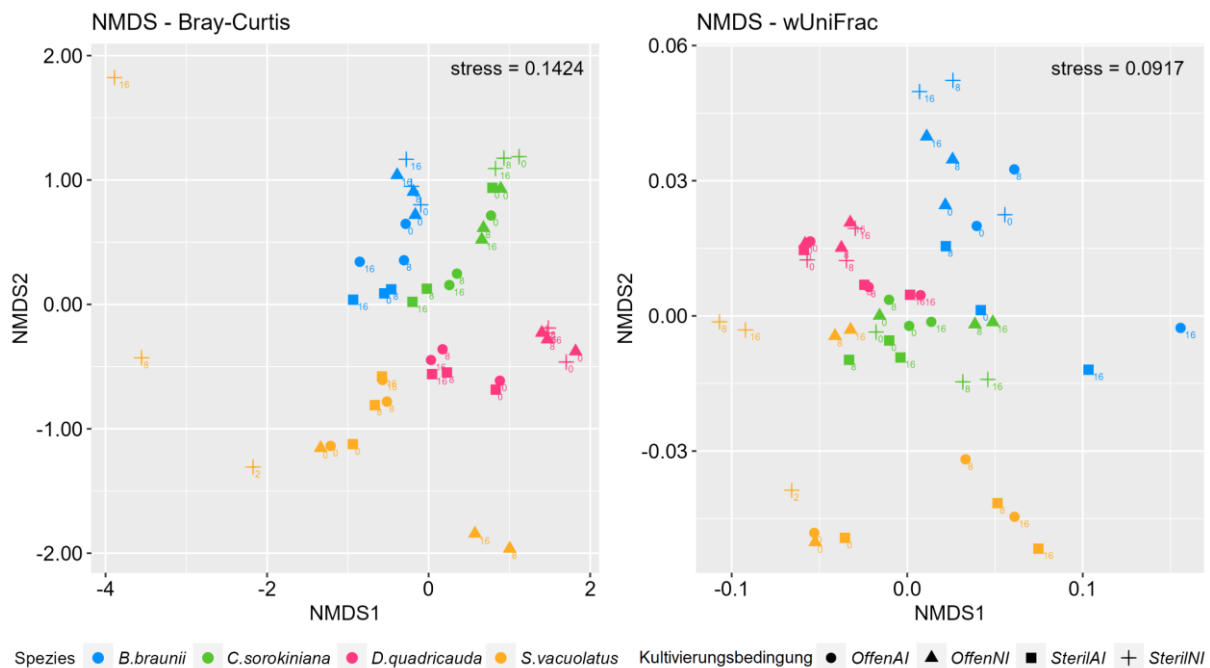


**Abbildung 23: Artenvielfalt (Richness) und Diversitätsindices (Shannon Index and Chao1) der Algengemeinschaft**

Vergleich der der bakteriellen Gemeinschaft aus *S. vacuolatus*, *D. quadricauda*, *C. sorokiniana* und *B. braunii* Kulturen der vier Kultivierungsbedingungen (offen NI, offen AI, steril NI, steril AI).



Die Struktur der bakteriellen Gemeinschaften wurden mittels NMDS von gewichteter UniFrac und Bray-Curtis Distanz-Metriken untersucht, um Unterschiede der  $\beta$ -Diversität der Mikrobiome der verschiedenen Kultivierungsbedingungen und Algenspezies zu beurteilen. Die Lage der Punkte im NMDS verdeutlicht, dass die Zusammensetzung der Mikrobiome stark von der jeweiligen Algenspezies beeinflusst wird (Abbildung 24).



**Abbildung 24: Struktur der bakteriellen Gemeinschaft im Nonmetric dimensional Scaling (NMDS) basierend auf Bray-Curtis-Unähnlichkeit und gewichteten UniFrac-Distanz**

Die Kulturen wurden nach Zugehörigkeit zur Algenspezies *S. vacuolatus* (grün), *D. quadricauda* (gelb), *C. sorokiniana* (pink) und *B. braunii* (blau) eingefärbt und die vier Kultivierungsbedingungen werden jeweils als Symbole (● offen NI, ▲ offen AI, ■ steril NI, + steril AI) dargestellt. Ordinationsstress <0.2 verdeutlicht die Güte des Model-Fits.

Die Unterschiede der Kultivierungsparameter (Algenspezies, Zeit und Kultivierungsbedingung) wurden mittels PERMANOVA getestet. Die Ergebnisse veranschaulichen, dass ein Großteil der Variation der Mikrobiome durch die Algenzugehörigkeit ( $R^2 = 58,6 / 41,1$ ) erklärt werden konnte (Tabelle 16). Auffällig ist außerdem, dass sich die Startpunkte (Tag 0) des Experimentes in der Mitte der artspezifischen Cluster befanden und die späteren Probezeitpunkte (Tag 4 und 8) eine höhere Variation der mikrobiellen Gemeinschaftsstruktur aufwiesen ( $R^2 = 5,8 / 8,4$ ). Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass sich die Zusammensetzung der Mikrobiome einer Algenspezies zu Beginn des Experiments sehr stark ähnelten und sich über den Verlauf immer weiter auseinanderentwickelten. Die Infektion mit Aphelidien hatte innerhalb der artspezifischen Cluster einen größeren Einfluss auf die Zusammensetzung als sterile/offene Kultivierungsumgebungen.

**Tabelle 16: Permanova-Analyse der Bray-Curtis-Dissimilaritäts- und Unifrac-Abstandsmatrizen**

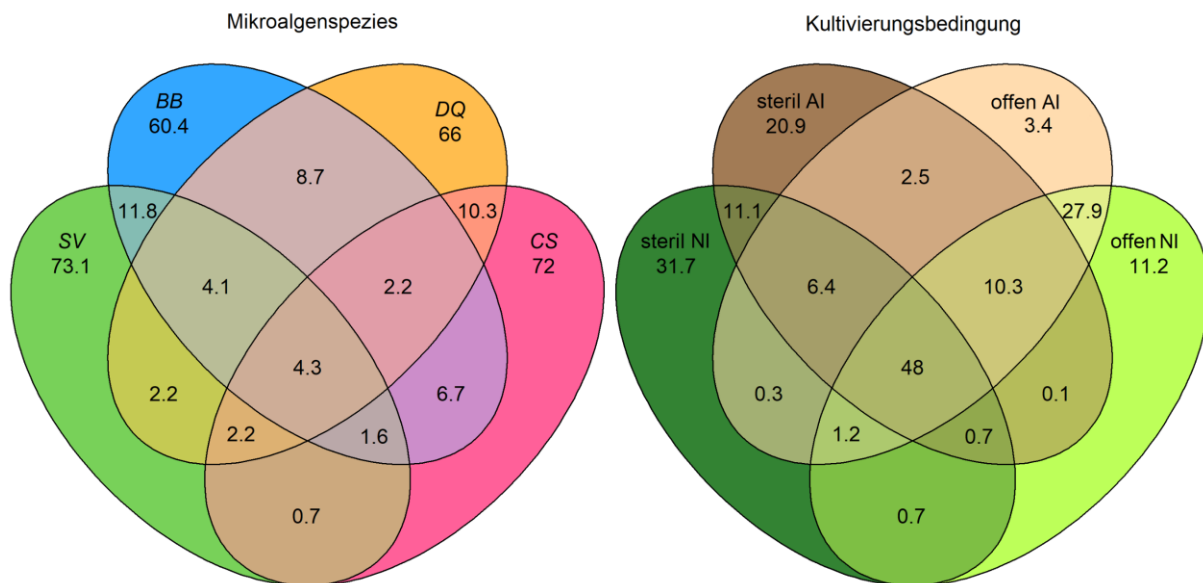
Es wurden die Auswirkungen des Algenwirts, der Inkubationszeit und der Kultivierungsbedingungen auf die Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft getestet. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) sind mit einem Sternchen (\*) gekennzeichnet.

Parameter	Bray-Curtis			wUnifrac		
	F-Model	R <sup>2</sup>	p-Wert	F-Model	R <sup>2</sup>	p-Wert
<b>Algenspezies</b>	26,6230	0,58641	0,001*	12,4427	0,41055	0,001*
<b>Inkubationszeit</b>	2,6394	0,05811	0,002*	2,5677	0,08472	0,021*
<b>Kultivierungsbedingung</b>	3,4921	0,07688	0,001*	2,6301	0,08678	0,009*
<b>Residuen</b>		0,27887			0,41794	

### 3.3.2 Taxonomische Zusammensetzung der bakteriellen Mikroalgen-gemeinschaft

In Übereinstimmung mit der Literatur wurden vornehmlich klassische limnische Bakterientaxa in den Mikrobiomen der vier Mikroalgenspezies nachgewiesen (Bižić-Ionescu *et al.* 2015). Die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft wurde von Vertretern des Superphylums Proteobacteria (65,0 %  $\alpha$ -, 27,9 %  $\gamma$ - und 0,8 %  $\delta$ -Proteobakterien) dominiert, während andere Taxa wie Bakteroidetes (0,6 %), Actinobacteria (0,6 %), Deinococcus-Thermus (0,07 %), und Firmicutes (0,01 %) nur einen geringen prozentualen Anteil ausmachten (Tabelle A1).

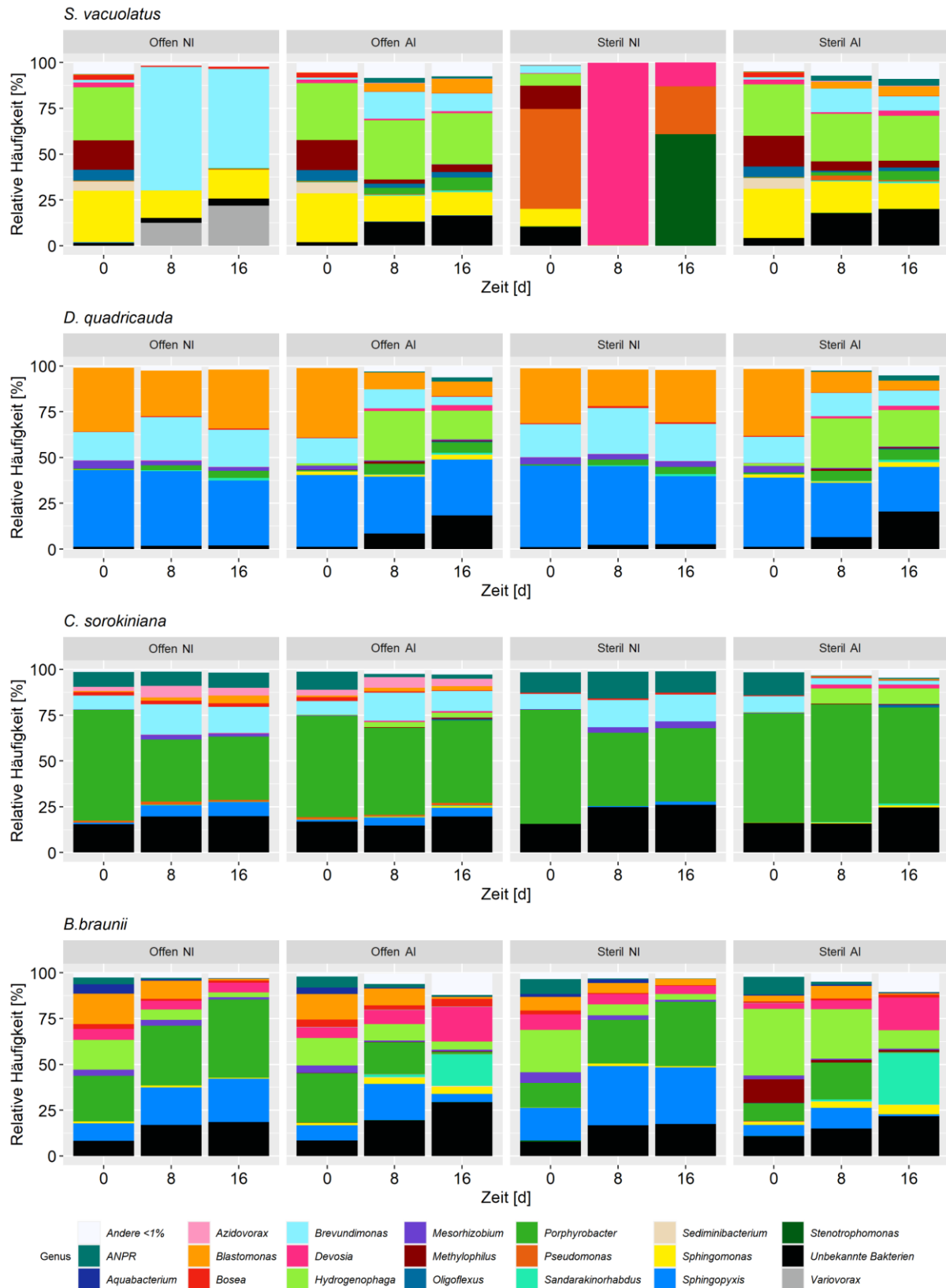
Die Zusammensetzung der bakteriellen Taxa in Abhängigkeit der Algenspezies verdeutlicht, dass ein Großteil der OTUs jeweils nur in Proben einer Mikroalgenspezies vorkam (73,1 %, 72,0 %, 60,4 %, 66,0 %) (Abbildung 25). Ordnet man das Vorkommen der bakteriellen OTUs nach Kultivierungsbedingungen wird klar, dass 48,0 % unabhängig von Infektion oder Kultivierungsumgebung beobachtet werden konnten. Nur 20,9 % (steril) bzw. 3,4 % (offen) der bakteriellen OTUs wurden ausschließlich in infizierten Kulturen gefunden, während 31,7 % (steril) bzw. 11,2 % (offen) nur in nicht infizierten Algenkulturen auftraten.



**Abbildung 25: Prozentuale Verteilung des Vorkommens bakterieller OTUs aus verschiedenen Mikroalgenpezies und Kultivierungsbedingungen**

Die Anzahl der Bakterien-OTUs wurde über alle Zeitpunkte akkumuliert die Überlappung der Gemeinschaft in Abhängigkeit von Algenpezies (*S. vacuolatus* (SV), *D. quadricauda* (DQ), *C. sorokiniana* (CS) *B. braunii* (BB) und Kultivierungsbedingungen (steril NI, steril AI, offen NI, offen AI) in VENN-Diagrammen dargestellt.

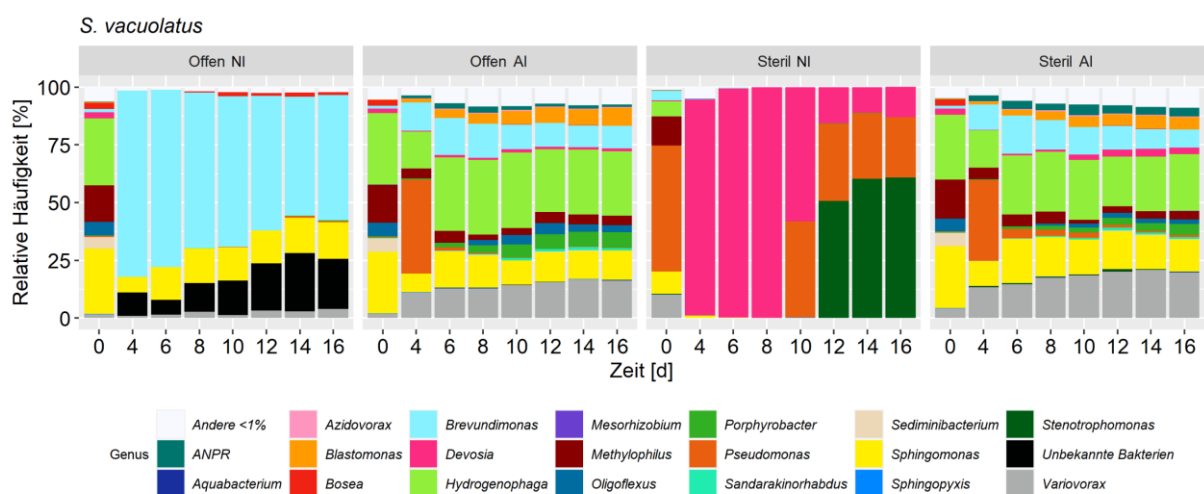
Es wurden deutlich unterschiedliche Zusammensetzungen der bakteriellen Mikrobiome hinsichtlich des Algenwirtes festgestellt. Obwohl geringe Variationen der Zusammensetzung durch Aphelidien-Infektionen und über den Zeitverlauf zu erkennen waren, blieben einige dominante Taxa unabhängig von den Kultivierungsbedingungen der jeweiligen Algenpezies stabil (Abbildung 26). Zwischen offenen und sterilen Kulturen wurden wiederum nur sehr geringe Abweichungen beobachtet. Das mit *S. vacuolatus* assoziierte Mikrobiom setzte sich hauptsächlich aus OTUs der Gattungen *Hydrogenophaga* (17,1 %), *Sphingomonas* (15,0 %) and *Brevundimonas* (14,6 %) zusammen. Die bakterielle Gemeinschaft in *C. sorokiniana* Kulturen zeichnete sich dagegen vornehmlich durch Vertreter der Gattungen *Porphyrobacter* (49,7 %) und *Brevundimonas* (10,4 %) aus. *D. quadricauda* Kulturen wurden von OTUs der Gattungen *Sphingopyxis* (36,3 %), *Blastomonas* (23,2 %) und *Brevundimonas* (15,6 %) dominiert, während die bakterielle Gemeinschaft von *B. braunii* mehrheitlich aus *Porphyrobacter* (20,7 %), *Sphingopyxis* (15,5 %), und *Hydrogenophaga* (13,2 %) zusammengesetzt war.



**Abbildung 26: Relative Häufigkeit der bakteriellen OTUs aus verschiedenen Mikroalgenkulturen und Kultivierungsbedingungen auf Gattungsebene**

Relative Häufigkeiten wurden in Abhängigkeit der Algenspezies (*S. vacuolatus*, *D. quadricauda*, *C. sorokiniana*, *B. braunii*) und Kultivierungsbedingungen (steril NI, steril AI, offen NI, offen AI) berechnet. Seltene Gattungen (<1 % rel. Häufigkeit) wurden als ‚Andere <1 %‘ und bakterielle OTUs, die nicht taxonomisch zugeordnet werden konnten, als ‚Unbekannte Bakterien‘ bezeichnet.

Eine Ausnahme stellten nicht infizierte *S. vacuolatus* Kulturen dar, die im Vergleich zu allen anderen Kulturen eine geringe Diversität aufwiesen. Hier wurden sowohl die größten Unterschiede zwischen offener und steriler Kultur beobachtet als auch eine hohe zeitliche Dynamik (Abbildung 27). Zu Beginn des Experimentes (Tag 0) ähnelten sich die Zusammensetzungen der bakteriellen Mikrobiome aller Kultivierungsbedingungen noch stark, doch in nicht infizierten Kulturen wurde ab Tag 4 eine strukturelle Veränderung der Gemeinschaft festgestellt, bei der anschließend *Brevundimonas* in offenen und zunächst *Devosia*, später *Pseudomonas* und *Stenotrophomonas* in der steril gehandhabten Kultur dominierten.



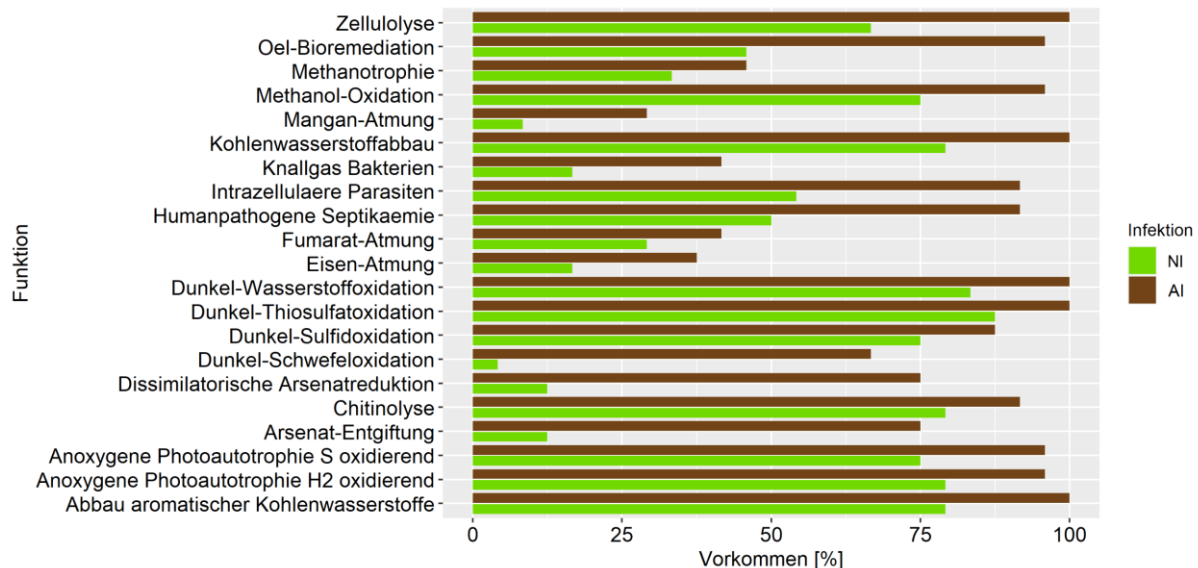
**Abbildung 27: Relative Häufigkeit der bakteriellen OTUs aus *S. vacuolatus*-Kulturen unter vier Kultivierungsbedingungen (steril NI, steril AI, offen NI, offen AI) auf Gattungsebene**

Seltene Gattungen (>1 % relative Häufigkeit), wurden als ‚Andere <1 %‘ zusammengefasst. Bakterien, die taxonomisch nicht genauer bestimmt werden konnten, wurden als ‚Unbekannte Bakterien‘ bezeichnet.

### 3.3.3 Funktionelle Analyse der bakteriellen Mikroalgencommunity

Die funktionellen Eigenschaften umfassten maßgeblich verschiedene phototrophe, photoheterotrophe und chemotrophe Funktionen. Außerdem waren funktionale Merkmale stark vertreten, die Bakterien zur Verstoffwechslung von mineralischen Nährstoffen wie Mangan, Nitrat, sowie Schwefel- und Eisen-Komponenten befähigen, die wichtige Bestandteile von Nährmedien zur Algenkultivierung darstellen. Trotz der großen algenspezifischen Unterschiede der Zusammensetzung der bakteriellen Mikrobiome, herrschte hinsichtlich der potenziellen funktionellen Diversität große Übereinstimmung zwischen den verschiedenen Mikroalgenpezies (Tabelle A2). Im Gegensatz dazu konnten eine Verschiebung der funktionellen Merkmale der Mikrobiome in den Kulturen beobachtet werden, die von Aphelidien infiziert wurden (Tabelle A3).

Eigenschaften die laut FAPROTAX Datenbank mit Funktionen der Entgiftung, Dunkeloxidation, Öl-Bioremediation, Zellulolyse und Chitinolyse assoziiert wurden, traten in AI Kulturen häufiger als in NI Kulturen auf (Abbildung 28).



**Abbildung 28: Bakterielle Funktionsvielfalt in infizierten (AI) und nicht infizierten (NI) Algenkulturen**

Das Vorhandensein jeder vorhergesagten Funktion basierend auf FAPROTAX nach Louca *et al.* (2016) wurde für jede Kultur berechnet und Abweichungen zwischen infizierten und nicht infizierten Kulturen von mehr als 10 % als Balkendiagramm dargestellt.

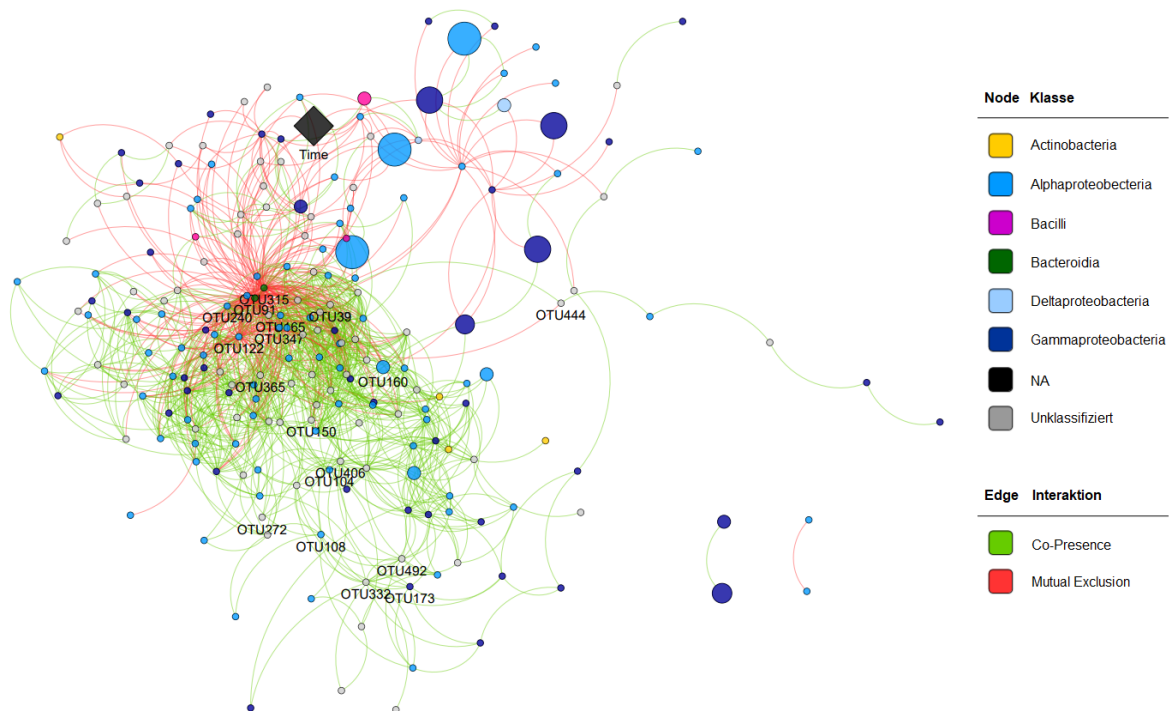
### 3.3.4 Interaktionsmuster der bakteriellen Mikroalgen-Gemeinschaft

Um die Interaktionsmuster der Mikrobiome der vier Algenspezies zu analysieren, wurden mikrobielle Netzwerke für jede Algenspezies einzeln berechnet und verglichen.

Die Interaktionsmuster der bakteriellen Gemeinschaften der verschiedenen Algenspezies unterschieden sich hinsichtlich Komplexität und Aufbau (Tabelle 17). Die Netzwerke ähneln sich mit 213 - 169 Nodes hinsichtlich der Anzahl stark, bezüglich der Interaktionen deuteten sich allerdings Unterschiede an. Während 213 Nodes das Netzwerk von *S. vacuolatus* über 1199 Edges verbanden (Abbildung 29), wies das Netzwerk von *C. sorokiniana* mit 2263 Edges beinahe doppelt so viele Verknüpfungen und den komplexesten Aufbau auf (Abbildung A2). Während in den Netzwerken von *S. vacuolatus*, *C. sorokiniana* und *B. braunii* (Abbildung A3) das Verhältnis von positiven zu negativen Interaktionen bei etwa 3:1 lag, konnten im Netzwerk von *D. quadricauda* prozentual mehr negative Interaktionen (40,6 %) beobachtet werden (Tabelle 17). Darüber hinaus wies es mit 16 Modulen die am stärksten geclusterte Struktur und somit auch den höchsten Cluster-Koeffizienten (0,59) auf (Abbildung A4). Somit interagierten im Netzwerk von *D. quadricauda* insbesondere benachbarte Nodes häufiger miteinander als in den anderen Netzwerken.

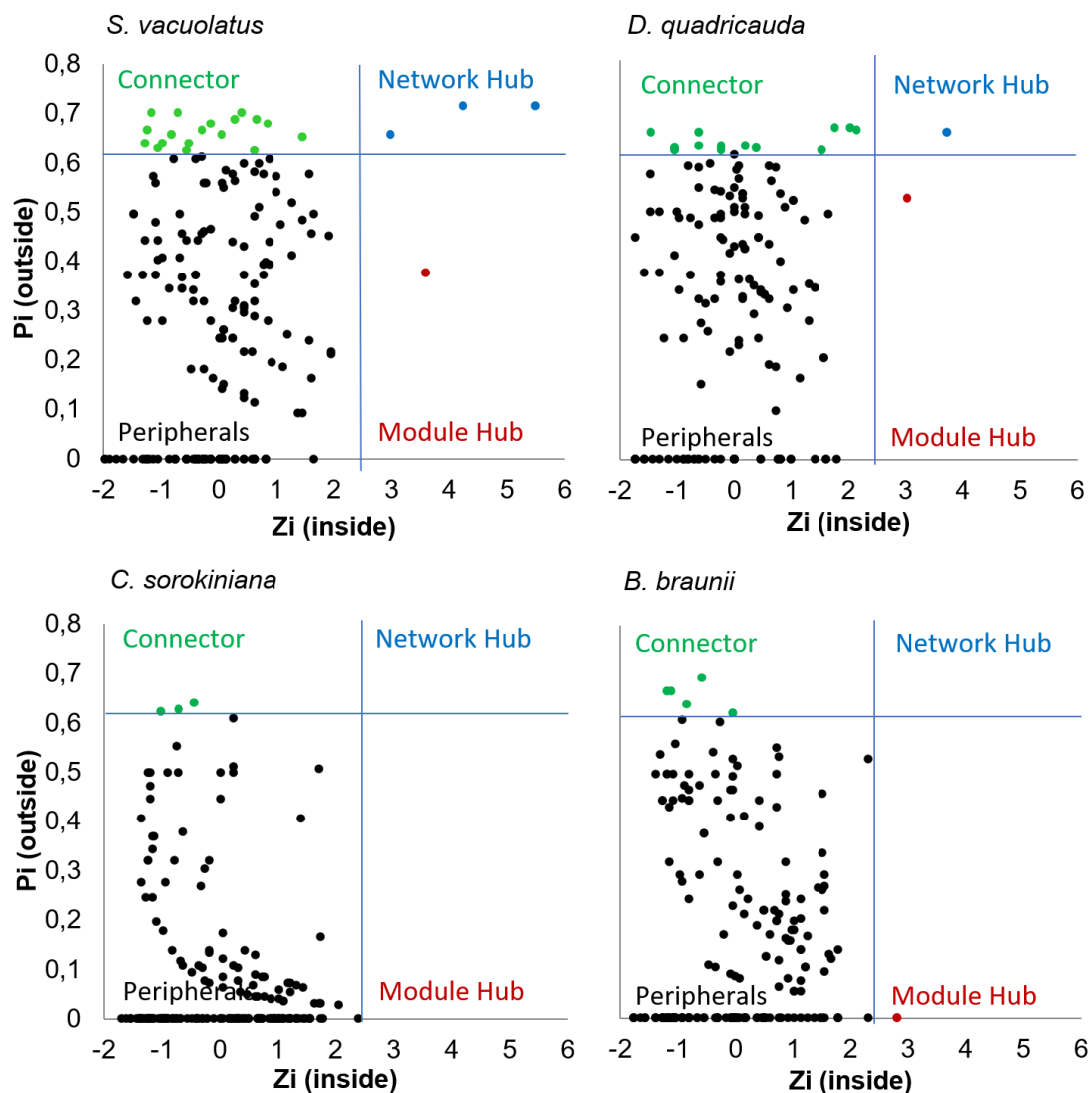
Tabelle 17: Charakteristika der berechneten OTU-Netzwerke

Networks	<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	<i>Desmodesmus quadricauda</i>	<i>Chlorella sorokiniana</i>	<i>Botryococcus braunii</i>
Nodes	213	167	192	193
Edges	1190	1342	2263	1362
Copresence	871 (73,2 %)	797 (59,4 %)	1586 (70,1 %)	983 (72,2 %)
Mutual Exclusion	319 (26,8 %)	545 (40,6 %)	677 (29,9 %)	379 (27,8 %)
Network density	0,053	0,123	0,097	0,074
Network heterogenity	1,104	0,748	0,975	0,846
Average path length	2,828	2,672	3,004	3,092
Network diameter	9	10	11	8
Cluster	9	16	7	6
Cluster Coefficient	0,48	0,59	0,47	0,45
Module Hub	1	1	0	1
Network Hub	3	1	0	0
Connector	18	15	3	5
Peripheral	191	150	189	187

Abbildung 29: Berechnetes OTU-Netzwerk für bakterielle Mikrobiome aus *S. vacuolatus*

Jede Node repräsentiert eine OTU, wobei OTUs mit entscheidenden topologischen Rollen mit der entsprechenden Nummer gekennzeichnet sind. Kultivierungsparameter (Time, Treatment) sind als Raute dargestellt, bakterielle OTUs als Kreis. Die Größe der Nodes spiegelt die Anzahl der Interaktionen wieder. Die verschiedenen Farben der Nodes zeigen die taxonomische Zuordnung an. Grüne Verbindungen stehen für positive Interaktionen (Co-Presence), rote Verbindungen für negative Interaktionen (Mutual Exclusion).

Anhand der Verbindungsmuster innerhalb des Netzwerkes (Topologie) können den Nodes verschiedenen Rollen zugewiesen werden (Abbildung 30). In allen Algenkulturen wiesen Mikroorganismen einen hohen Grad an Spezialisierung auf. Im Netzwerk von *C. sorokiniana* und *B. braunii* konnten nur drei, bzw. sechs OTUs als Generalisten (z. B. als Connectoren) anhand ihrer Interaktionsmuster eingeordnet werden und zusätzlich war dort der Anteil an Peripherals (Spezialisten) am höchsten. Mikroorganismen in den Netzwerken von *S. vacuolatus* und *D. quadricauda* waren hingegen weniger stark spezialisiert und wiesen den größten Anteil an Nodes mit generalistischer Topographie auf. Die meisten dieser generalistischen Nodes gehörten zu den Ordnungen  $\beta$ -proteobacteria, Caulobacterales, Rhizobiales und Sphingomonadales. Lediglich eine OTU ( $\beta$ -Proteobacteria) wurde anhand ihrer Topologie als Generalist in mehr als einem Netzwerk identifiziert.



**Abbildung 30: Einteilung bakterieller OTUs in verschiedenen Algenkulturen anhand ihrer topologischen Rollen im Netzwerk**

Alle OTUs wurden anhand ihrer Intramodul-Konnektivität (Zi) und Intermodul-Konnektivität (Pi) einer der vier Gruppen zugewiesen (Guimerà und Nunes Amaral 2005).

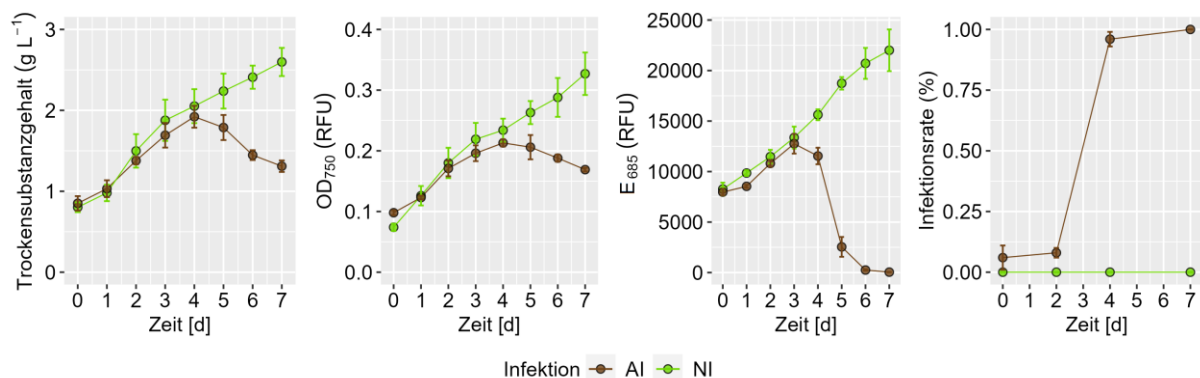


### 3.4 Funktionelle Analyse der Aphelidien-Infektion

Um die funktionellen Profile von Mikroalgen und assoziierten Bakterien über einen Infektionsverlauf mit *A. protococcarum* AI15TR im Vergleich zu einer gesunden Kultur zu untersuchen, wurden Metaproteomik-Analysen von infizierten und nicht infizierten *S. vacuolatus*-Kulturen durchgeführt.

#### 3.4.1 Verlauf der Aphelidien-Infektion

Schon ab dem vierten Tag konnte eine rapide Abnahme der  $E_{685}$  in infizierten Algenkulturen beobachtet werden, während der TS-Gehalt und die  $OD_{750}$  erst nach fünf Tagen langsam abnahmen (Abbildung 31). Fluoreszenzmikroskopische Analysen nach WGA-Färbung bestätigen, dass die Infektionsrate bereits zwischen zwei und vier Tagen nach der Infektion mit Aphelidien von 10 % auf 90 % schnell anstieg und nach sieben Tagen mit 100 % abgeschlossen war (Abbildung 31).



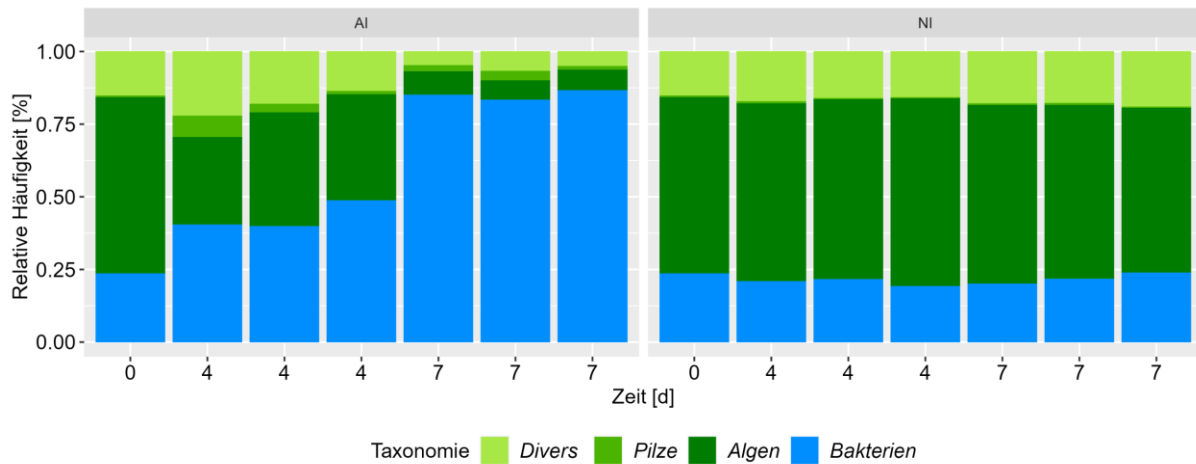
**Abbildung 31: Trockenstoffgehalt, optische Dichte ( $OD_{750}$ ), Chlorophyll a-Fluoreszenz ( $E_{685}$ ) von *S. vacuolatus*-Kulturen.**

Apheliden-infizierten (AI, braun) und nicht infizierten (NI, grün) Kulturen wurden über einen Verlauf von sieben Tage täglich beprobt ( $n=3 \pm SD$ ). Die Infektionsrate wurde durch fluoreszenzmikroskopische Beobachtung der Infektionszustände der Mikroalgenzellen ermittelt ( $n=3 \pm SD$ ).

#### 3.4.2 Metaproteomische Zusammensetzung der Mikroalgencommunity

Insgesamt konnten 1935 bakterielle und 1786 eukaryotische PG (1290 Algen-PGs, 67 Pilz-PGs und 468 diverse eukaryotische PGs) festgestellt werden. Die taxonomische Verteilung der PGs unterschied sich deutlich in Abhängigkeit der Anwesenheit von *A. protococcarum* und der Inkubationszeit (Abbildung 32). Die Proteinmuster in nicht infizierten (NI) Kulturen blieben im Laufe der Zeit stabil und wurden zu etwa 75 % von eukaryotischen (hauptsächlich Algen-PGs) und bakteriellen PG (25 %) dominiert. Im Gegensatz dazu nahm in aphelidien-infizierten (AI) Kulturen die Gesamtzahl der Algen- und diversen eukaryotischen PGs kontinuierlich ab.

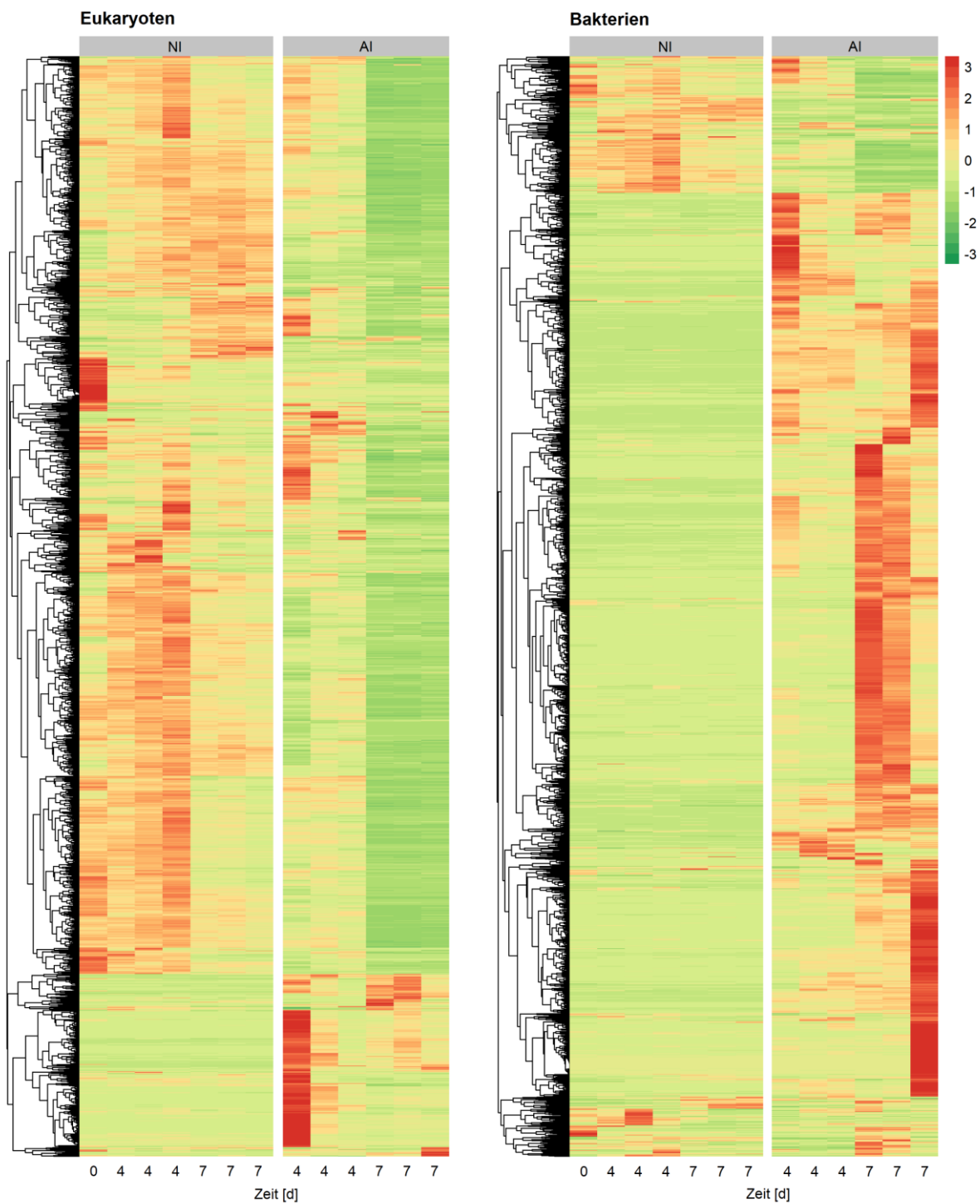
Pilzliche Proteingruppen waren besonders an Tag vier stark vertreten und nahmen dann im Verlauf wieder leicht ab. Besonders bakterielle PGs nahmen im Laufe der Aphelidien-Infektion stetig zu und erreichten nach 7 Tagen etwa 90 % relative Häufigkeit (Abbildung 32).



**Abbildung 32: Zusammensetzung der Proteingruppen (PG) aus *S. vacuolatus*-Kulturen nach taxonomischer Klassifizierung auf Ebene von Domäne und Reich**

Bakterielle PG (blau) und eukaryotischen PC (Algen = dunkelgrün, Pilze = grün, diverse eukaryotische PGs = hellgrün) wurden entsprechend farblich gekennzeichnet. Die relative Häufigkeit der PGs wurde in nicht infizierten (NI) und infizierten (AI) *S. vacuolatus*-Kulturen null, vier und sieben Tage nach Infektion bestimmt ( $n=3 \pm SD$ ).

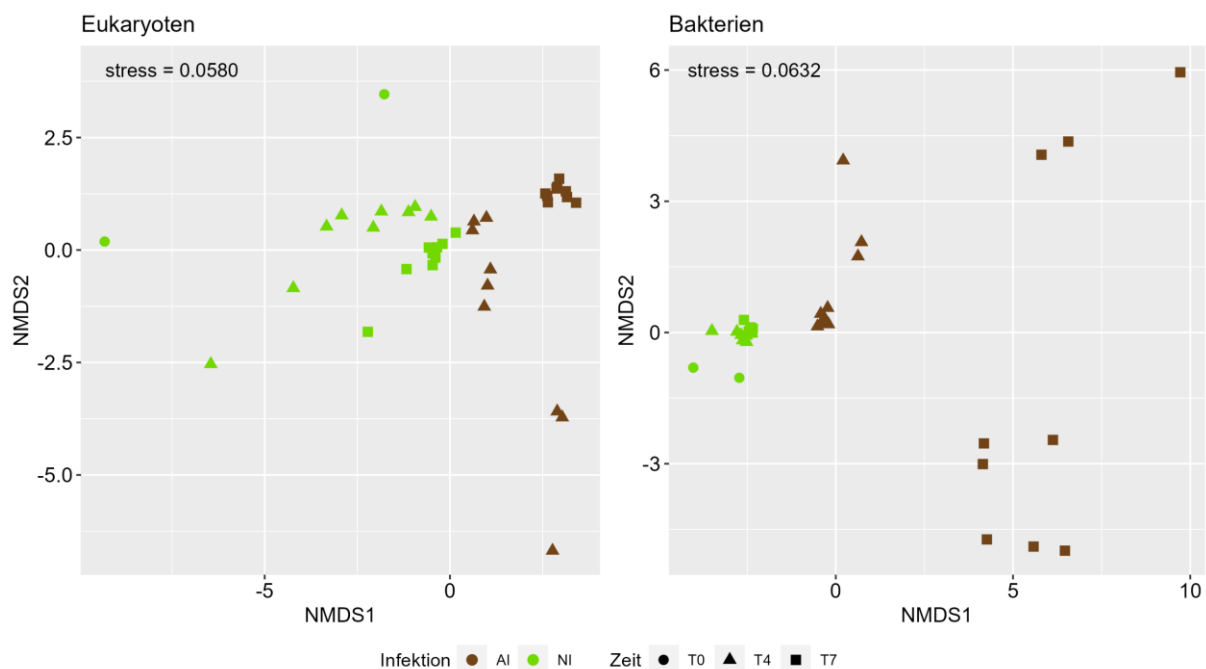
Die Abundanz der Algen-, Pilz- und Bakterien-PGs unterstreicht die unterschiedliche Ausprägung der Proteinmuster von NI- und AI Kulturen (Abbildung 33). Das Abundanz-Muster der Algenproteine in NI-Kulturen war zu Beginn der Inkubation noch ähnlich ausgeprägt und änderte sich leicht nach sieben Tagen. In AI Kulturen wurden jedoch auffällige Verschiebungen beobachtet, und die meisten Algen-PGs nahmen in ihrer Häufigkeit ab. Eine kleine Gruppe von pilzlichen Proteinen, die in NI-Kulturen nur selten vorkommen, wiesen in AI Algenkulturen eine hohe Abundanz auf, insbesondere vier Tage nach der Infektion. Im Gegensatz dazu wiesen bakterielle PGs komplementäre Abundanz-Muster auf, wenn NI und AI Kulturen verglichen werden (Abbildung 33). Die meisten bakteriellen Proteine, die in AI Kulturen nur in geringer Häufigkeit gefunden wurden, waren in NI Kulturen stark vertreten und umgekehrt.



**Abbildung 33: Relative Abundanz von eukaryotischen und bakteriellen PGs aus *S. vacuolatus*-Kulturen im zeitlichen Verlauf**

Rote Farben zeigen höhere, grüne Farben niedrigere Proteinabundanzen von infizierten (AI) und nicht infizierten (NI) *S. vacuolatus*-Kulturen null, vier und sieben Tage nach der Inokulation an. Der auf der Anwesenheit von PGs basierende Baum stellt die Gruppierung der euklidischen PG-Distanzen dar.

Basierend auf der Analyse der  $\beta$ -Diversität bildeten eukaryotische PGs in AI und NI Kulturen zwei lose, aber getrennte Cluster in der NMDS Darstellung aus (Abbildung 34). Eine multivariate Permutationsanalyse ergab, dass 36,7 % der Varianz durch den Infektionsstatus und nur 13,8 % durch die Inkubationszeit erklärt werden konnten (Tabelle 18). Das Streuungsmuster der bakteriellen PGs unterschied sich ebenfalls signifikant ( $p=0,001^*$ ) zwischen AI und NI Kulturen ( $R_2=29,7$ ). Die PGs der NI Kulturen hatten unabhängig von der Inkubationszeit eine geringe Varianz zueinander, während AI Kulturen entlang beider Achsen eine im Verlauf der Infektion ansteigende Varianz aufwiesen (Abbildung 34).



**Abbildung 34: Nichtmetrische dimensionale Skalierung (NMDS) auf der Grundlage euklidischer Distanzen der Abundanzen von bakteriellen und eukaryotischen Proteingruppen**

*S. vacuolatus*-Kulturen mit Apheliden-Infektion (AI, braun) und ohne Apheliden-Infektion (NI, grün) sind zu Beginn der Inkubation (●), nach vier (▲) und sieben (■) Tagen nach der Inokulation dargestellt. Ordinations-stress <0.2 impliziert einen passenden fit des Modells.

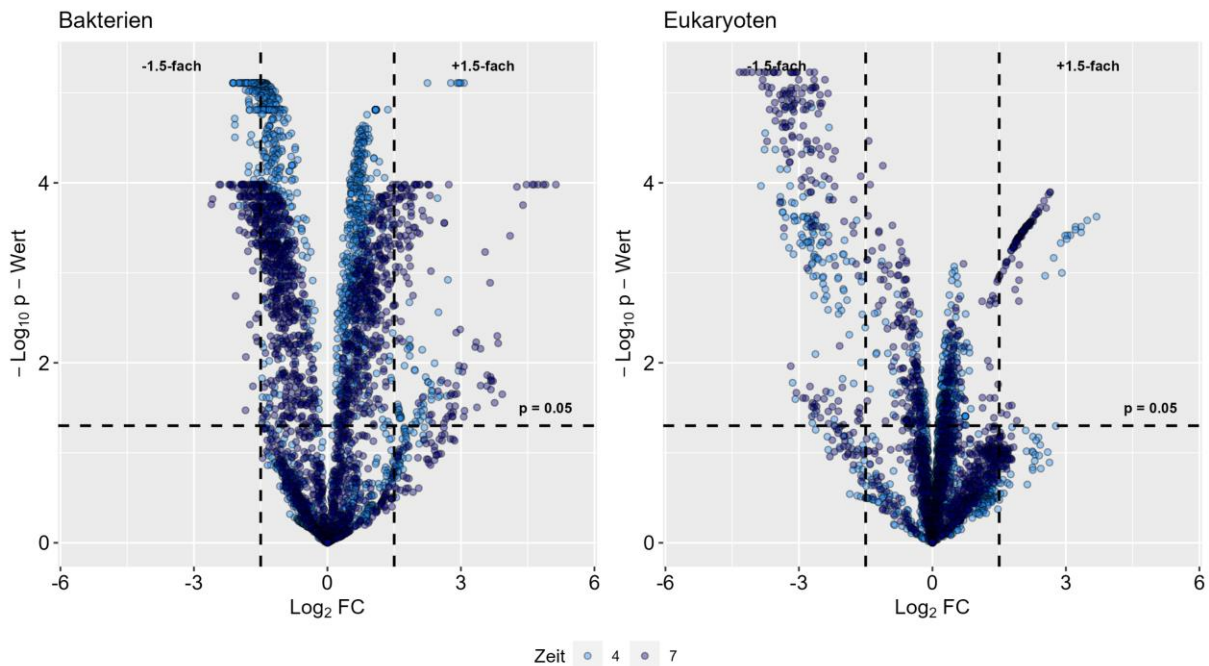
**Tabelle 18: Unterschiede der euklidischen Abstände der Proteinprofile anhand einer PERMANOVA-Analyse**

Es wurden die Auswirkungen der Infektion mit *A. protooccarum* AI15TR und der Inkubationszeit auf die Proteinprofile von Bakterien und Algen wurden getestet. Signifikante Unterschiede ( $p<0,05$ ) sind mit einem \*Sternchen gekennzeichnet.

Parameter	Eukaryoten		Bakterien	
	R <sup>2</sup>	p-Wert	R <sup>2</sup>	p-Wert
Infektion	0,36717	0,001*	0,29713	0,001*
Inkubationszeit	0,13853	0,001*	0,16647	0,001*
Residuen	0,49430		0,53641	

### 3.4.3 Funktionelle Analyse der Mikroalgencommunity

Um die PGs zu bestimmen, die große Expressionsunterschiede zwischen aphelidien-infizierten und nicht infizierten Proben aufweisen, wurden für beide Datensätze Log<sub>2</sub>-Fold-Changes (FC) bestimmt. Insgesamt wurden 373 eukaryotische und 423 bakterielle PGs mit signifikanten FC > ±1,5 zwischen NI und AI Kulturen gefunden (Abbildung 35).



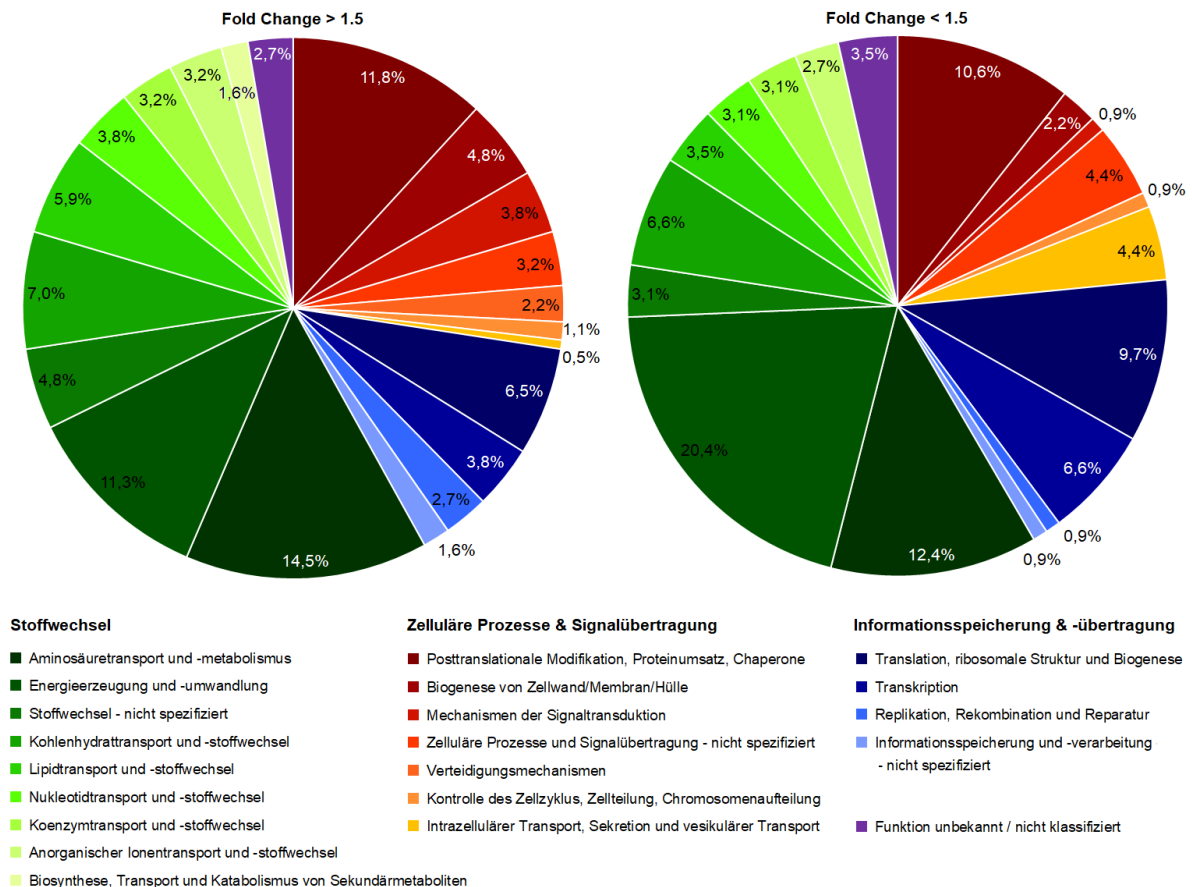
**Abbildung 35: Verteilung der Expressionsunterschiede bakterieller und eukaryotischer PGs zwischen aphelidien-infizierten (AI) und nicht infizierten (NI) *S. vacuolatus*-Kulturen**

Die PG-Veränderungen (Log<sub>2</sub>FC) wurden zwischen AI und NI Kulturen nach vier Tagen (hellblau) und sieben Tagen (dunkelblau) Inkubation berechnet. Log<sub>2</sub>-FCs wurde gegen  $-\log^{10}$  transformierte p-Werte aufgetragen, um signifikant ( $p > 0,05$ ) erhöhte ( $FC > 1,5$ ) und erniedrigte ( $FC < -1,5$ ) Proteine zu detektieren.

Um zu untersuchen, welche Aktivitäten durch die Apheliden-Infektion ausgelöst werden, wurden die funktionellen Rollen eukaryotischer und bakterieller PGs mit hohen FCs anhand der Egnog, KEGG und Pfam Datenbank mittels Prophanen kategorisiert.

Die wichtigsten überexprimierten bakteriellen PGs in infizierten Kulturen wurden überwiegend der übergeordneten funktionellen Gruppe ‚Stoffwechsel‘ zugeordnet (55,4 %), während ‚zelluläre Prozesse und Signalübertragung‘ etwa 27,4 % und ‚Informationsspeicherung und -verarbeitung‘ 14,5 % ausmachten (Abbildung 36). Die Funktionen der hochregulierten und häufig vorkommenden PGs waren mit dem Stoffwechsel und Transport von Aminosäuren, Lipiden, Coenzymen, Nukleotiden und Kohlenhydraten sowie der Energieproduktion verknüpft (Tabelle 19).

Andere PGs, die den Aminosäurestoffwechsel, die Energieproduktion, posttranslationale Modifikationen sowie die Zellwandbiogenese betreffen, wurden in AI-Kulturen herunterreguliert. Darüber waren mehrere hochregulierte PGs vertreten, die laut Literatur an pathogenen Interaktion Bakterien und Wirtspflanzen beteiligt sind (Tabelle A4). Es wurden beispielsweise Proteine aus der Familie der Transpeptidase-Transglycosylasen, der Vorläufer des äußeren Membranproteins A (ompA) und Histidinkinasen gefunden.

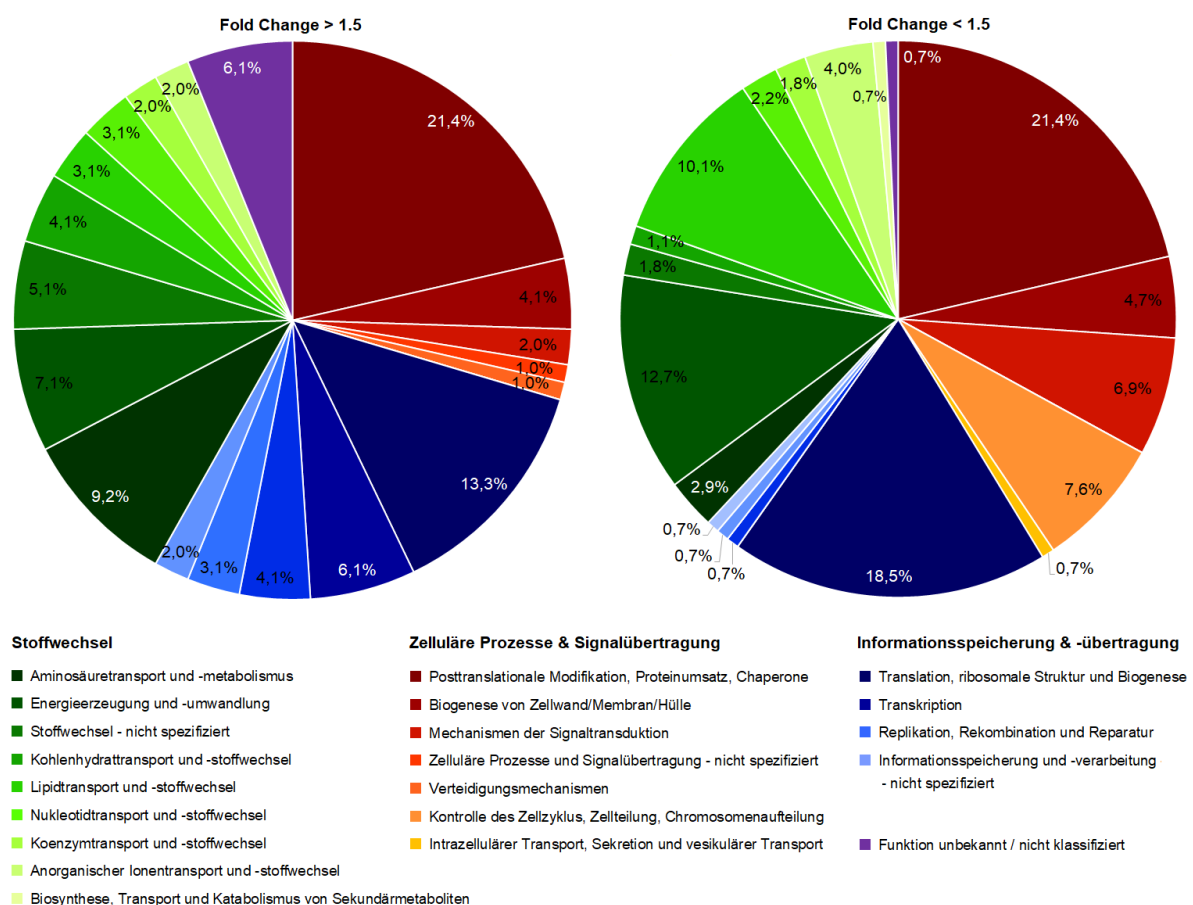


**Abbildung 36: Funktionelle Verschiebung der bakteriellen Proteingruppen (PG) zwischen infizierten (AI) und nicht infizierten (NI) *S. vacuolatus*-Kulturen mit Fold Changes >1,5 (links) und Fold Changes <1,5 (rechts)**

PGs wurden in funktionelle auf der Grundlage der EggNOG-Datenbank durch Prophane kategorisiert. Relative Anteile jeder PG-Kategorie, die in AI Kulturen im Vergleich zur NI Kulturen häufiger (197 PGs) oder weniger häufig (226 PGs) vorkommen.

Die meisten eukaryotischen PGs, die große FCs aufwiesen, wurden während der Aphelidien-Infektion deutlich herunterreguliert (276 Proteine). Insbesondere die Abundanz vieler PGs aus den Bereichen ‚Translation, ribosomale Struktur und Biogenese‘, ‚Posttranslationalmodifikationen, Proteinumsatz, Chaperone‘, sowie ‚Energieproduktion‘ und ‚Kohlenhydratstoffwechsel‘ und einige andere Kategorien waren nach einer Aphelidien-Infektion rückläufig (Tabelle 20). Insgesamt 98 PGs wurden unter infektiösen Bedingungen überexprimiert und

wurden den Funktionsgruppen ‚Posttranslationalmodifikationen, Proteinumsatz, Chaperone‘ und ‚Translation, ribosomale Struktur und Biogenese‘ zugeteilt (Abbildung 37). Proteine, die in der Literatur mit pathogenen Interaktionen zwischen Pflanzen und Pilzen in Verbindung gebracht werden, wurden in einigen Fällen mit erhöhten, in anderen Fällen mit verringerter Abundanz beobachtet (Tabelle A5). Es wurde beispielsweise eine erhöhte Abundanz für ein LRR-6-Protein in infizierten Kulturen festgestellt. Mustererkennungsrezeptoren mit leucinreichen Wiederholungen (LRR-RLK) sind ein wichtiger pflanzlicher Abwehrmechanismus gegen verschiedene Pathogene. Darüber hinaus waren Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase und ABC-Transporter-verwandte Proteine unter infektiösen Bedingungen hochreguliert, die in der Literatur ebenfalls wiederholt mit pflanzenpathogenen Interaktionen in Verbindung gebracht wurden. Für andere PGs, die mit der pflanzlichen Abwehr gegen Pilzbefall in Verbindung gebracht werden, wie z. B. Hitzeschockproteine oder Proteasom-Untereinheiten, konnten keine erhöhten Aktivitäten beobachtet werden.



**Abbildung 37: Funktionelle Verschiebung der eukaryotischen Proteingruppen (PG) zwischen infizierten (AI) und nicht infizierten (NI) *S. vacuolatus*-Kulturen mit Fold Changes >1,5 (links) und >-1,5 (rechts)**

Die PGs wurden in funktionelle Gruppen eingeteilt, basierend auf der EggNOG-Datenbank von ProPhane. Relative Anteile jeder PG-Kategorie, die in AI Kulturen im Vergleich zu NI-Kulturen häufiger (98 Proteine) oder weniger häufig (276 Proteine) vorkommen.



**Tabelle 19: Liste der häufigsten (>0,1 % relative Häufigkeit) bakteriellen Proteingruppen mit Fold Changes (FC) > 1,5**

Funktionellen Annotationen anhand von Prophanen mit zugehörigen KEGG EC- und KO-Nummern und Pfam Accessions

FC	Funktionelle Gruppe	Funktionelle Kategorie	Funktionelle Beschreibung	EC	KO	Pfam
1,55	Zelluläre Prozesse und Signalübertragung	Posttranslationalmodifikationen, Proteinumsatz, Chaperone	Hitzeshock protein 70 kDa	-	K04043	PF00012
1,86	Informationsspeicherung und -verarbeitung	Transkription	Transkriptionaler Regulator, LuxR Familie	-	K13041	PF00196 PF00072
1,78	Informationsspeicherung und -verarbeitung	Replikation, Rekombination und Reparatur	Mutmaßliche Exonuklease SbcCD, C subunit	-	K03546	PF13476, PF13558
1,75	Informationsspeicherung und -verarbeitung	Translation, ribosomale Struktur und Biogenese	Fördert die Bindung von Aminoacyl-tRNA Ribosomen während der Proteinbiosynthese	-	K02358	PF00009
1,66	Informationsspeicherung und -verarbeitung	Replikation, Rekombination und Reparatur	RNA Helikase	3.6.4.13	K12823	PF00270, PF00271
3,76	Stoffwechsel	Stoffwechsel – nicht spezifiziert	Reduktion von aktiviertem Sulfat zu Sulfid	1.8.4.10, 1.8.4.8	K00390	PF01507
2,95	Stoffwechsel	Aminosäuretransport und -stoffwechsel	ABC-Type Transport verzweigtkettiger Aminosäuren	-	K11959	PF13433
2,87	Stoffwechsel	Co-Enzymtransport und -stoffwechsel	Tetrapolymerisation des Monopyrrols PBG zu Porphobilinogen-Deaminase	2.5.1.61	K01749	PF01379
2,73	Stoffwechsel	Aminosäuretransport und -stoffwechsel	Argininsuccinat-Synthase	6.3.4.5	K01940	PF00764
2,30	Stoffwechsel	Kohlenhydrattransport und -stoffwechsel	RuBisCO	4.1.1.39	K01601	PF00016
2,29	Stoffwechsel	Nukleotidtransport und -stoffwechsel	Carbamoyl-Phosphat Synthetase	6.3.5.5	K01955	PF02786
1,95	Stoffwechsel	Fetttransport und -stoffwechsel	Katalysiert Acetat zu Acetyl-CoA	6.2.1.1	K01895	PF16177, PF00501
1,86	Stoffwechsel	Energieproduktion und -umwandlung	Isocitrat/Isopropylmalat Dehydrogenase	1.1.1.42	K00031	PF00180
1,66	Stoffwechsel	Energieproduktion und -umwandlung	Glutamat/Leucin/Phenylalanin/Valin Dehydrogenase	-	-	PF00208
1,53	Stoffwechsel	Aminosäuretransport und -stoffwechsel	Cysteine Synthase	2.5.1.47	K01738	PF00291
1,79	Stoffwechsel	Stoffwechsel – nicht spezifiziert	Protease Pfpl	-	-	PF01965



**Tabelle 20: Liste der häufigsten (> 0,1 % relative Häufigkeit) eukaryotischen Proteingruppen mit Fold Changes (FC) >1,5**

Funktionellen Annotationen anhand von Prophanen mit zugehörigen KEGG EC- und KO-Nummern und Pfam Accessions

FC	Funktionelle Gruppe	Funktionelle Kategorie	Funktionelle Beschreibung	EC	KO	PFAM
-4,24	Zelluläre Prozesse und -Signalübertragung	Zytoskelett	ATP Bindung	-	K05692	Actin
-4,17	Zelluläre Prozesse und -Signalübertragung	Posttranslationsmodifikationen, Proteinumsatz, Chaperone	Peptidase S8 Familie, related to Autophagie	3.4.21.48	K01336	Peptidase_S8
-3,14	Zelluläre Prozesse und -Signalübertragung	Posttranslationsmodifikationen, Proteinumsatz, Chaperone	C-Terminal Domain von 1-Cys Peroxiredoxin	1.11.1.15	K03386	1-cysPrx_C
-2,71	Informationsspeicherung und -verarbeitung	Translation, ribosomale Struktur and Biogenese	GTP-abhängige Bindung von Aminoacyl-tRNA an Ribosomen während der Proteinbiosynthese	-	K03231	GTP_EFTU
-4,34	Stoffwechsel	Nukleotidtransport und -stoffwechsel	Nucleosid Diphosphat-Kinase	2.7.4.6	K00940	NDK
-3,53	Stoffwechsel	Kohlenhydrattransport und -stoffwechsel	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase	1.2.1.12	K00134	Gp_dh_C
-3,08	Stoffwechsel	Nukleotidtransport und -stoffwechsel	Nucleosid Diphosphat-Kinase	2.7.4.6	K00940	NDK
-1,66	Stoffwechsel	Kohlenhydrattransport und -stoffwechsel	Fructose-Bisphosphat Aldolase	4.1.2.13	K01623	Glycolytic

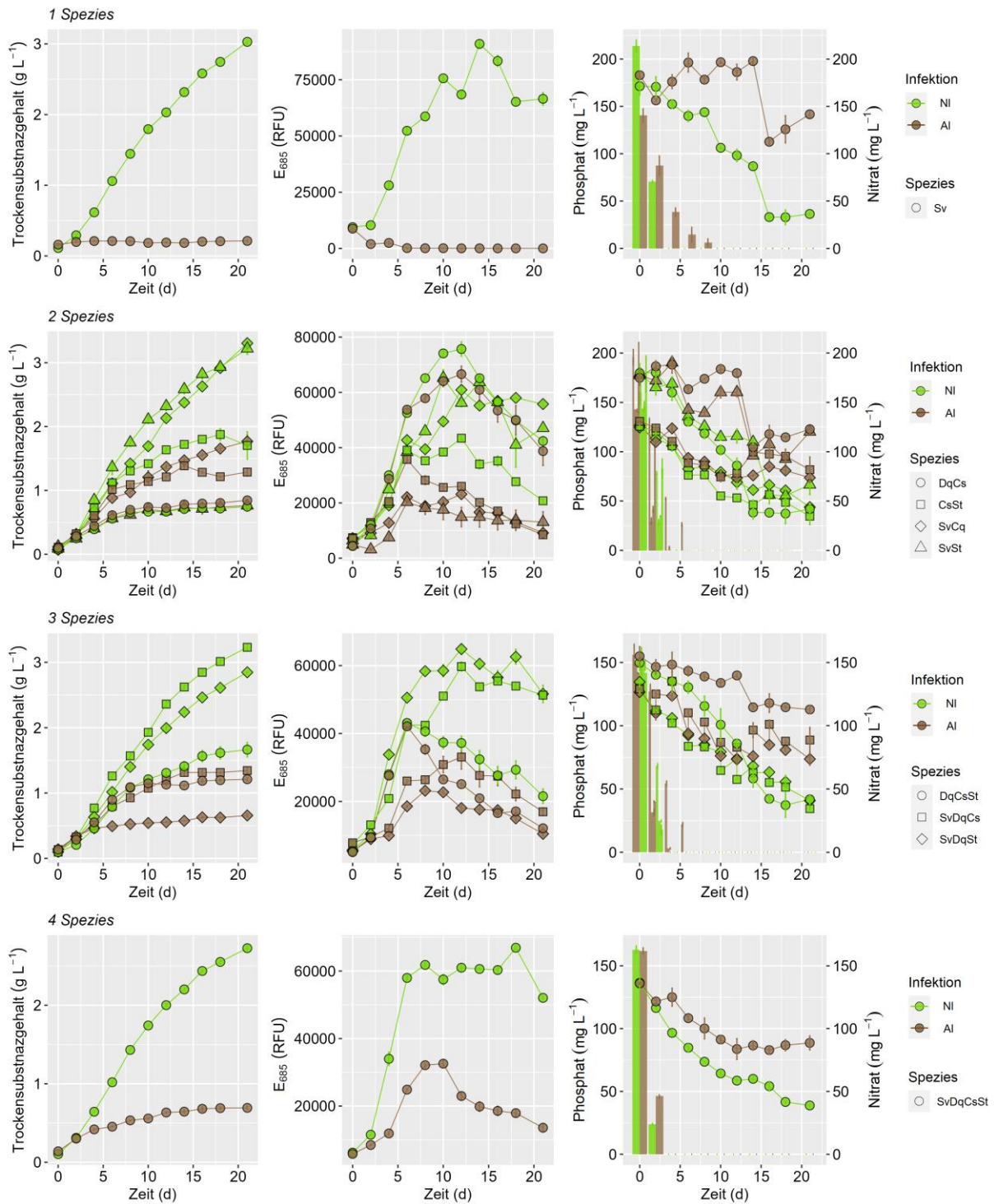
### 3.5 Präventive Behandlungsstrategien gegen Aphelidien-Infektionen

Es wurden drei verschiedene Strategien verfolgt, um eine präventive Strategie zur Stabilisierung von Mikroalgenkulturen gegen spezifischen Parasiten wie Aphelidien zu erproben.

#### 3.5.1 Infektionsverlauf bei verschiedenen Algen-Polykulturen in verschiedenen Diversitätsstufen

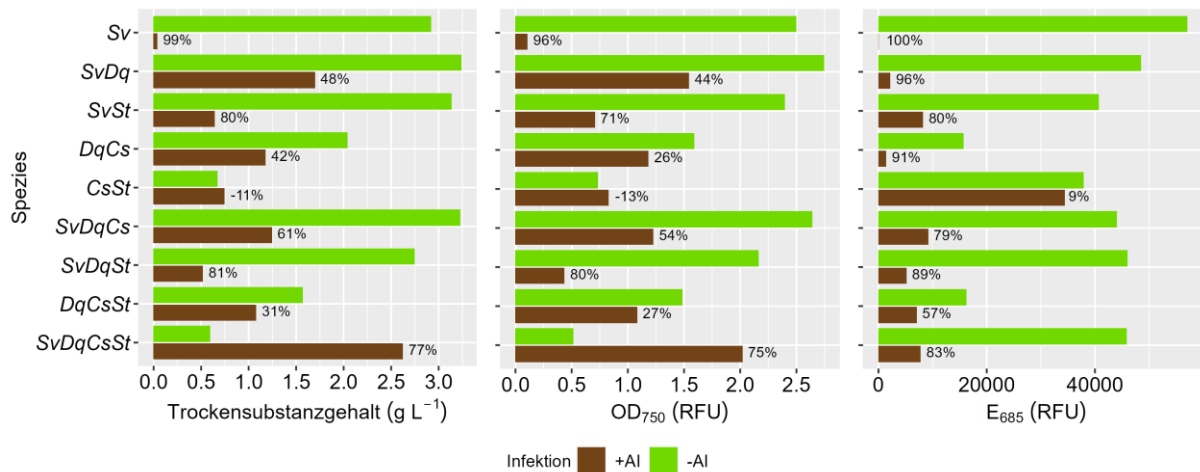
Es wurden Infektionsexperimente mit neun verschiedenen Kombinationen von Algenstämmen und Diversitätsstufen durchgeführt. Die Analyse der Wachstumsparameter der Polykulturen zeigte zunächst, dass alle AI Kulturen von den Auswirkungen der Infektion betroffen waren und geringere TS- und  $E_{685}$ -Zuwächse als NI-Kulturen verzeichneten (Abbildung 38). Dabei sind Kombinationen mit drei oder vier Arten ähnlich stark von der Infektion betroffen wie Kombinationen aus nur zwei Algenspezies, sodass kein direkter Effekt der Artenanzahl zu erkennen war. Es zeichneten sich stattdessen spezifische Unterschiede in Abhängigkeit der beteiligten Arten ab, die auch bei den getesteten Monokulturen beobachtet wurden.

Da Wachstumskurven sich nicht zu einem quantitativen Vergleich der Auswirkung einer Infektion eigneten, wurde erneut die Produktivität sowie die Virulenz in Bezug auf TS-Gehalte,  $OD_{750}$  und  $E_{685}$  über 21 Tage berechnet (Abbildung 39). Zunächst bestätigte sich, dass mehrere NI-Polykulturen ähnlich gute oder bessere Produktivität erzielten wie eine *S.vacuolatus*-Monokultur (Sv). Des Weiteren wurden bei allen Polykulturen niedrigere Virulenzen der Infektion mit *A. protococcarum* AI15TR als bei *S. vacuolatus* als Monokultur verzeichnet. Beim Hauptwirt Sv wurden wie schon in vorangegangenen Experimenten Virulenzen von um die 100 % verzeichnet (Abbildung 39). Die niedrigsten Virulenzen wurden in Kulturen mit Algen-Kombinationen erzielt, an denen Sv nicht beteiligt ist, wie beispielsweise *C.sorokiniana* mit *Stichococcus* sp. ( $V_{TS}$ : -11 %,  $V_{750}$ : -13 %,  $V_{685}$ : 6 %).



**Abbildung 38: Verlauf von Trockensubstanzgehalt und E<sub>685</sub>, sowie Phosphat und Nitrat-Gehalt von neun unterschiedlichen Algen-Polykulturen**

Es wurden jeweils infizierte Kulturen (AI, braun) und gesunde Kontrollkulturen (NI, grün) über einen Verlauf von 21 Tagen täglich beprobt ( $n = 2 \pm \text{SD}$ ). Kulturen bestehend aus einer ( $\bullet$ ), zwei ( $\times$ ), drei ( $\blacktriangle$ ) und vier Spezies ( $\blacksquare$ ) sind entsprechend gekennzeichnet.



**Abbildung 39: Darstellung des Zuwachses von Trockensubstanzgehalt, optischen Dichte (OD<sub>750</sub>) und Chlorophyll a Fluoreszenz (E<sub>685</sub>) bei neun verschiedenen Polykulturen**

Es wurden jeweils infizierte (AI in braun) und nicht infizierte Kulturen (NI in grün) betrachtet. Die prozentualen Angaben kennzeichnen die berechnete Virulenz von AI15TR bei neun Polykulturen.

Die mikroskopische Auswertung der Artenzusammensetzung über den Verlauf von 21 Tagen verdeutlicht, dass alle NI Polykulturen, an denen Sv beteiligt von dieser Spezies mit relativen Anteilen zwischen 65 - 80 % dominiert wurde (Abbildung 40). Alle NI Kulturen weisen nach ca. zwei bis acht Tagen eine spezifische, stabile Verteilung der Algenspezies bis zum 21. Tag auf. In Polykulturen mit Kombinationen ohne Sv setzte sich Dq gegen Cs und St in der Zellzahl über die Inkubationszeit durch. Cs konnte sich nur durchsetzen, wenn Sv und Dq nicht vorhanden waren, während St in allen nicht infizierten Kombinationen nur verschwindend geringe Anteile (< 5 %) aufwies (Abbildung 40). Diese Abstufung der Zellzahl in Polykulturen stellte die umgekehrte Reihenfolge der abgeleiteten Virulenz für Aphelidien-Infektionen dar, sodass sich die Anteile der Algenspezies in den infizierten Kulturen umkehrte. In allen AI Kulturen nahm der Anteil von Sv vom zweiten bis zum vierten Tage bis auf wenige Prozent ab. Je nach Kombination konnten sich dann verschiedene Arten unter infektiösen Bedingungen durchsetzen. In allen Kombinationen an denen Dq beteiligt ist, nahm diese Spezies nach dem Absterben von Sv auch in AI Kulturen zunächst den größten Anteil (60 - 80 %) ein, wurde dann über die Zeit aber ebenfalls von Aphelidien infiziert, sodass der relative Anteil auf ~20 – 60 % zurückgeht. In Kombinationen mit Cs und/oder St steigt der prozentuale Anteil dieser Arten im Vergleich zu Dq zum Ende hin nochmal an. Cs nimmt auch in allen AI Polykulturen einen geringen Anteil der Zusammensetzung (~10 - 20 %) ein, außer in der Kombination mit St. In dieser Kultur findet sich ein dauerhaftes Gleichgewicht in gesunden Kulturen von ca. 80:20, in infizierten Kulturen ist das Verhältnis mit 70:30 zugunsten von St verschoben (Abbildung 40). St hat auch in den meisten infizierten Kulturen nur einen geringen Anteil (~10 - 20 %), nimmt aber über den Verlauf zu. Nur in den Zweierkombination mit Sv, dominiert St nach dem Zusammenbruch der Sv-Population bis zum Ende des Experimentes mit ~80 - 90 %.

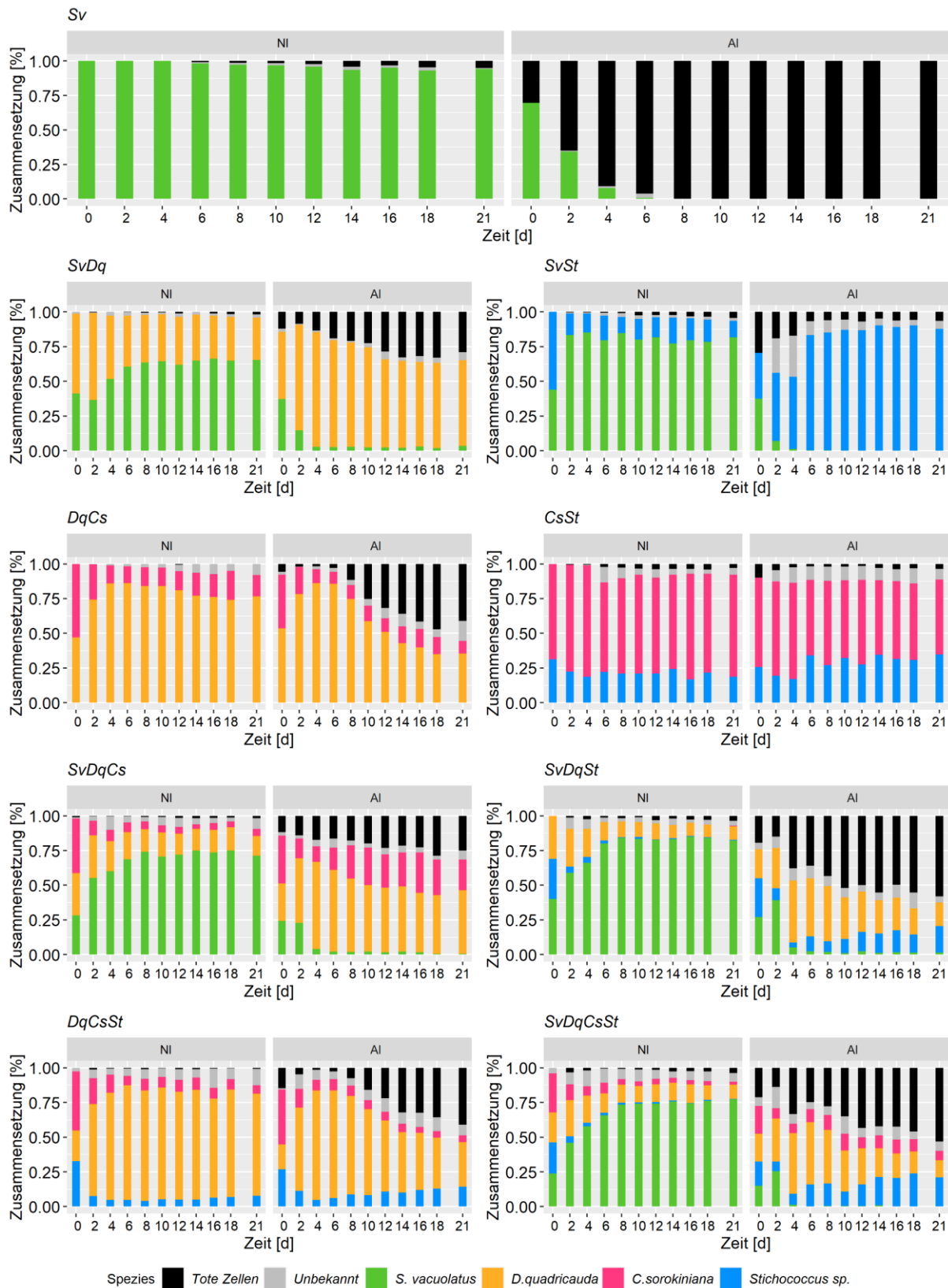
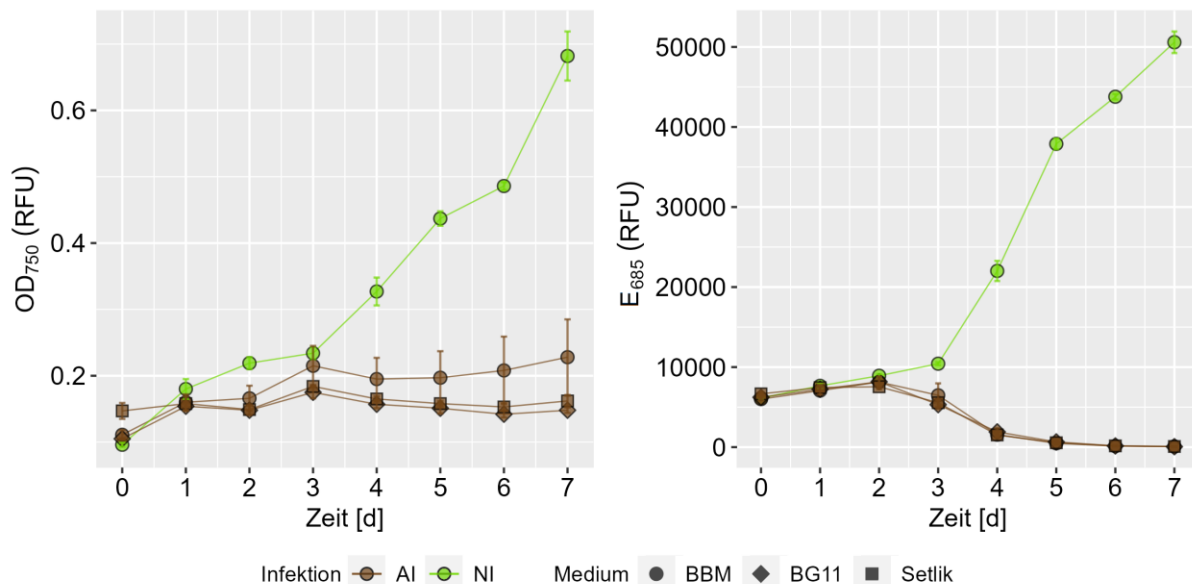


Abbildung 40: Prozentuale Zusammensetzung der Mikroalgen-Spezies in infizierten (AI) und nicht infizierten (NI) Polykulturen über den Verlauf von 21 Tagen

### 3.5.2 Einfluss von abiotischen Kultivierungsparametern auf den Infektionsverlauf

Der Lebenszyklus von spezifischen Parasiten wie Aphelidien wird unter anderem von abiotischen Faktoren aus der Umwelt beeinflusst. Deshalb wurden verschiedene prozessimmanente Kultivierungsparameter, wie die Nährstoffverfügbarkeit, Beleuchtungs-, Begasungs-, sowie Temperaturregime variiert, um ihren Einfluss auf den Infektionsverlauf zu untersuchen.

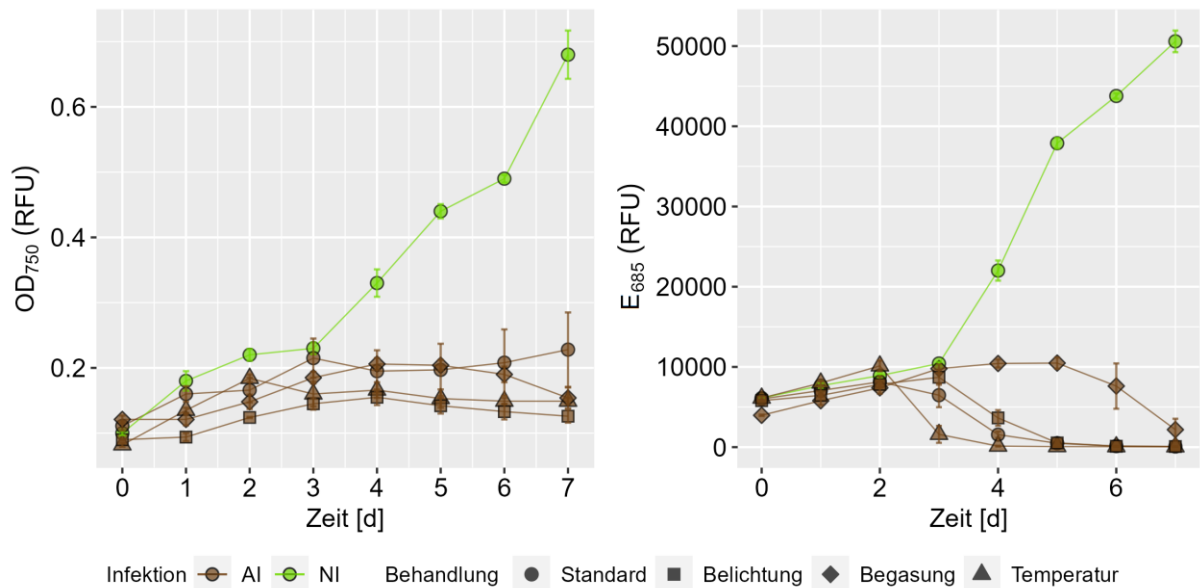
Variationen des Kulturmediums in AI Kulturen zeigten im Vergleich zur Kultivierung unter Standardbedingungen nur geringe Unterschiede im Infektionsverlauf (Abbildung 41). Für alle verwendeten Medien, die sich vornehmlich in der Verfügbarkeit der Stickstoffquelle und einiger weiterer Makroelemente unterscheiden (Kapitel 2.1), wurde kein deutlicher Effekt auf die Virulenz (Abbildung 43) und die Infektionsgeschwindigkeit  $V_{50}$  beobachtet (Tabelle 21).



**Abbildung 41: Infektionsverlauf von *S. vacuolatus*-Kulturen in verschiedenen Medien**

Die infizierten Kulturen wurden in BBM, Setlik und BG11 Medium über sieben Tage kultiviert und täglich beprobt ( $n = 3 \pm SD$ ). Als Vergleich zu den infizierten Kulturen (AI) dient eine nicht infizierte Kultur in BBM Medium (NI).

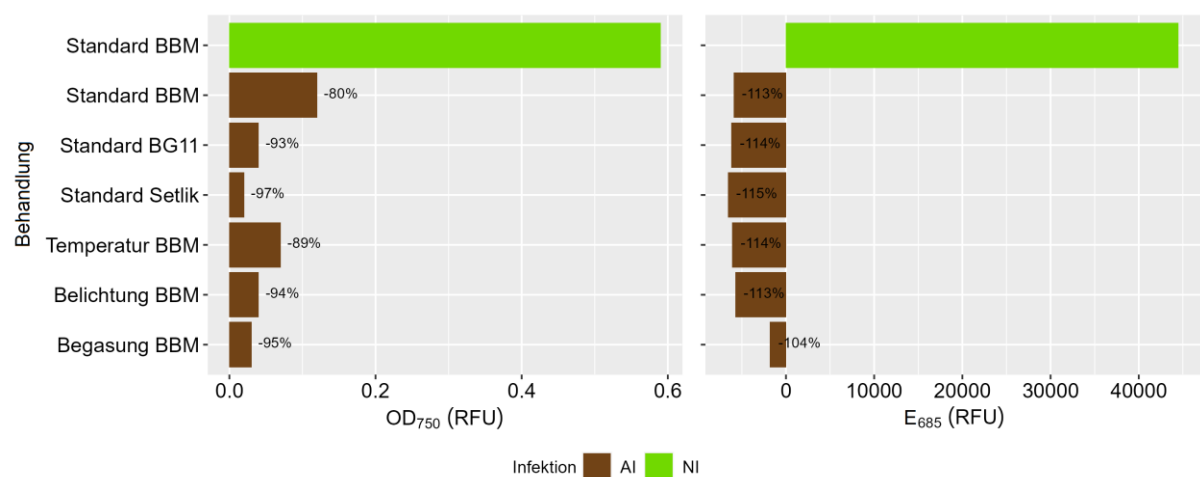
Des Weiteren wurden Temperatur-, Beleuchtungs- und Begasungsregime verändert, um deren Auswirkungen auf den Infektionsverlauf zu untersuchen (Abbildung 42). Im Vergleich zur Standardbehandlung hat eine Erhöhung der Temperatur auf 30 °C zu einer leichten Beschleunigung der Infektion geführt. Die Einführung einer Dunkelphase von 10 h hingegen zeigt kaum Unterschiede zur 24 h Dauerbeleuchtung der Standardbehandlung. Eine deutliche Verzögerung der Infektion wurde jedoch durch die zusätzliche Einführung einer anoxischen Phase während der 10 h Dunkelphase bewirkt (Abbildung 43).



**Abbildung 42: Infektionsverlauf von *S. vacuolatus* in verschiedenen Kultivierungsbehandlungen**

Die infizierten Kulturen wurden mit Standard-Kultivierungsparametern (siehe Tab.1), mit erhöhter Temperatur (30 °C), angepasster Belichtung (14:10 h) oder veränderter Begasung (10 h 100 % CO<sub>2</sub>) in BBM Medium über sieben Tage kultiviert und täglich beprobt (n=3±SD). Als Vergleich zu den infizierten Kulturen (AI) dient eine nicht infizierte Kultur in BBM Medium (NI).

Die Berechnung der Virulenz bemisst schädigende Effekte der Aphelidien-Infektion über die gesamte Inkubationszeit, sodass mittels der Virulenz verzögernde Effekte nicht gut abgebildet werden können. Da die Variation der Kultivierungsparameter die Infektion nur verzögert, innerhalb von sieben Tagen aber nicht verhindern konnte, wiesen die verschiedenen Behandlungen nur marginale Unterschiede hinsichtlich der Virulenz auf (Abbildung 43).



**Abbildung 43: Darstellung des Zuwachses der Optischen Dichte (OD<sub>750</sub>) und Chlorophyll a Fluoreszenz (E<sub>685</sub>) bei verschiedenen Kulturbehandlungen**

Es wurden jeweils infizierte (AI in braun) und nicht infizierte Kulturen (NI in grün) in verschiedenen Medien und Kulturbehandlungen betrachtet. Die prozentualen Angaben kennzeichnen die berechneten Virulenzen (V<sub>750</sub> und V<sub>685</sub>) von AI15TR.

Im Gegensatz dazu eignet sich die Bestimmung der Infektionsgeschwindigkeit  $V_{50}$  besonders gut zur Quantifizierung verzögernder Effekte (Tabelle 21). Die Erhöhung der Umgebungstemperatur führte zu einer schnelleren Entwicklung der Parasiten und somit zu einer schnelleren Zerstörung der Algenzellen im Vergleich zur Standardbehandlung. Die Beschleunigung führte zu einer Verschiebung von  $V_{50}$  auf 2,4 Tage was einer Beschleunigung um 25 % entspricht. Die Einführung einer Dunkelphase allein hatte zunächst nur einen geringen Einfluss auf die Infektion ( $V_{50} = 3,8$  Tage). Wird die Dunkelphase allerdings zusätzlich mit einer Begasung mit 100 %  $\text{CO}_2$  kombiniert, zeigte sich eine deutliche Entschleunigung des Infektionsablaufes und eine Verschiebung des  $V_{50}$  Wertes um ca. 2,9 Tage, sodass das Überleben der Algenkulturen um 82 % verlängert wurde.

**Tabelle 21: Einfluss verschiedene Kultivierungsregimes auf die Infektionsgeschwindigkeit**

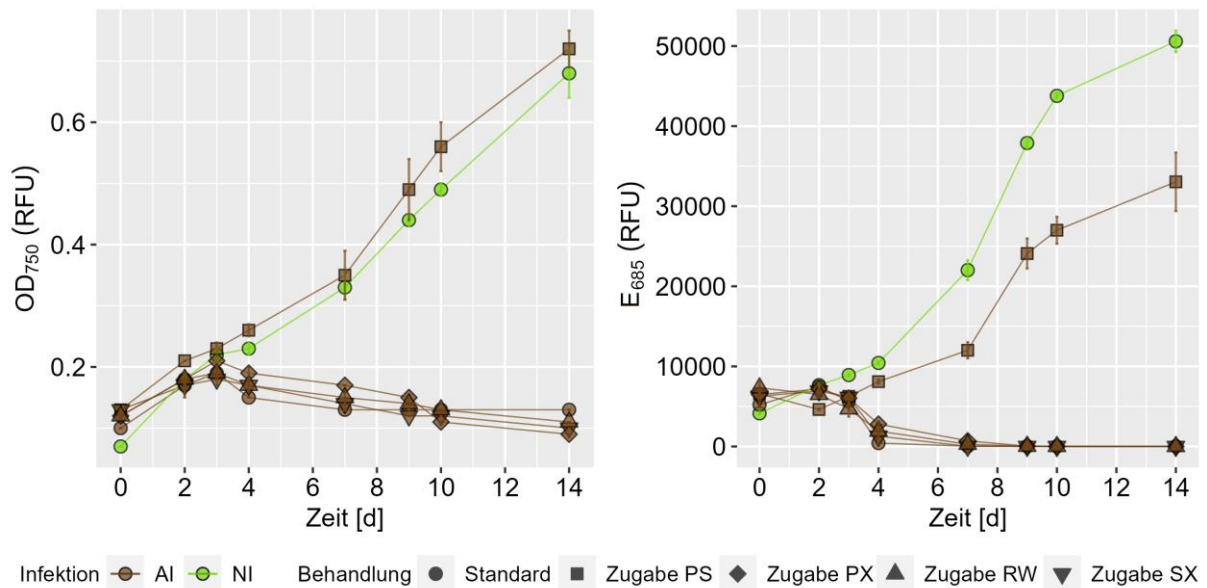
$V_{50}$  wird anhand eines DoseResp-Modells des Rückgangs der  $E_{685}$  ( $n = 3 \pm \text{SD}$ ) bestimmt und kennzeichnet den Zeitpunkt zu dem 50 % der Chlorophyll a Fluoreszenz eingebüßt wurden.

Behandlung	Medium	Temperatur	Belichtung	Begasung	$V_{50}$
Standard	BBM	23,5 °C	24 h	24 h 1 % $\text{CO}_2$	3,55 d
Standard	BG11	23,5 °C	24 h	24 h 1 % $\text{CO}_2$	3,54 d
Standard	Setlik	23,5 °C	24 h	24 h 1 % $\text{CO}_2$	3,61 d
Temperatur	BBM	30 °C	24 h	24 h 1 % $\text{CO}_2$	2,35 d
Belichtung	BBM	23,5 °C	14 h	24 h 1 % $\text{CO}_2$	3,84 d
Begasung	BBM	23,5 °C	14 h	14 h 1 % $\text{CO}_2$ / 10h 100 % $\text{CO}_2$	6,54 d

### 3.5.3 Einfluss von bakteriellen Co-Kulturen auf den Infektionsverlauf

Ergebnisse der phylogenetischen und funktionellen Analyse des Algenmikrobioms während einer Aphelidien-Infektion haben gezeigt, dass neben der Algenpopulation auch die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft und deren metabolischen Aktivität immensen Veränderungen unterliegt. Deshalb wurde untersucht, ob eine gezielte Veränderung des bakteriellen Mikrobioms direkten Einfluss auf den Infektionsverlauf nehmen kann. Gegenüber der Standardbehandlung (Tabelle 22) wurde eine Co-Kultivierung von *S. vacuolatus* mit *Pseudomonas protegens* (PS), *Sphingopyxis terrae* (ST), *Pseudoxanthomonas* sp. (SX) und *Rhizobium wuzhouense* (RW) untersucht. Während die Co-Kultivierung mit den drei aus *S. vacuolatus*-Kulturen isolierten Bakterienstämmen keine Auswirkung auf den Infektionsprozess bewirkte, konnte die Aphelidien-Infektion in Anwesenheit von *Pseudomonas protegens* sehr deutlich reduziert werden (Abbildung 44).

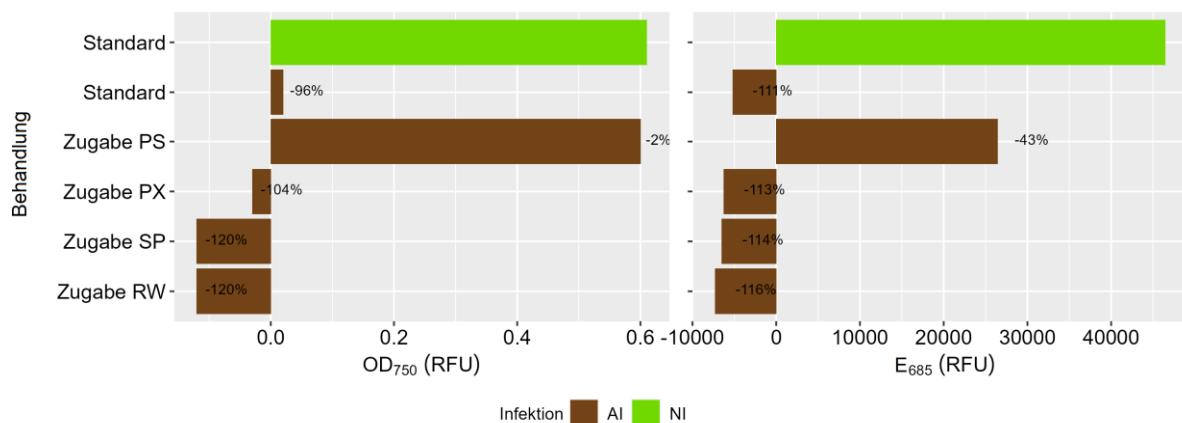




**Abbildung 44: Infektionsverlauf von *S. vacuolatus* in verschiedenen bakteriellen Co-Kulturen**

Die infizierten Co-Kulturen von *S. vacuolatus* mit *Pseudomonas protegens* (PS), *Sphingopyxis terrae* (ST), *Pseudoxanthomonas* sp. (SX) und *Rhizobium wuzhouense* (RW) wurden über sieben Tage in modifizierten BBM kultiviert und täglich beprobt ( $n=3 \pm SD$ ). Als Vergleich zu den infizierten Co-Kulturen (AI) dienten eine infizierte Kultur (AI) sowie eine nicht infizierte Kultur (NI) unter Standardbedingungen.

Durch die Co-Kultivierung mit *P. protegens* konnte über einen Zeitraum von 14 Tagen alle Anzeichen einer Aphelidien-Infektion verhindert werden. In diesen Kulturen wurde sowohl eine stetige Zunahme der  $OD_{750}$  und  $E_{685}$  Werte verzeichnet, sowie eine um 95 ( $V_{750}$ ) bzw. 68 ( $V_{685}$ ) Prozentpunkte reduzierte Virulenz im Vergleich zur Standardbehandlung beobachtet (Abbildung 45). Die Infektionsgeschwindigkeit  $V_{50}$  von 15,3 Tagen zeigt eine extreme Verzögerung der Infektionsgeschwindigkeit um knapp 12 Tage oder 365 % (Tabelle 22).



**Abbildung 45: Darstellung des Zuwachses der Optischen Dichte ( $OD_{750}$ ) und Chlorophyll a Fluoreszenz ( $E_{685}$ ) bei verschiedenen Co-Kulturen**

Es wurden jeweils infizierte (AI in braun) und nicht infizierte (NI in grün) Kulturen in verschiedenen Medien und Kulturbehandlungen betrachtet. Die prozentualen Angaben kennzeichnen die berechnete Virulenz ( $V_{750}$  und  $V_{685}$ ) von AI15TR.

**Tabelle 22: Einfluss zugegebenen Bakterienstämme auf die Infektionsgeschwindigkeit**

$V_{50}$  wird anhand eines DoseResp-Modells des Rückgangs der  $E_{685}$  ( $n=3\pm SD$ ) bestimmt und kennzeichnet den Zeitpunkt zu dem 50 % der Chlorophyll *a* Fluoreszenz eingebüßt wurden.

Behandlung	Medium	Temperatur	Belichtung	Begasung	$V_{50}$
Standard	BBM	23,5 °C	24 h	24 h 1 % CO <sub>2</sub>	3,28 d
Zugabe PS	BBM	23,5 °C	24 h	24 h 1 % CO <sub>2</sub>	15,27 d
Zugabe SX	BBM	23,5 °C	24 h	24 h 1 % CO <sub>2</sub>	3,58 d
Zugabe PX	BBM	23,5 °C	24 h	24 h 1 % CO <sub>2</sub>	3,51 d
Zugabe RW	BBM	23,5 °C	24 h	24 h 1 % CO <sub>2</sub>	3,67 d

## 4 Diskussion

Die Auswirkung von Infektionen mit *Amoebophilidium protococcarum* auf das Wachstum verschiedener Algenstämme (Kapitel 4.1) und die Zusammensetzung der assoziierten bakteriellen Gemeinschaft (Kapitel 4.2), sowie funktionelle Änderungen auf Proteinebene, die mit der Infektion in Verbindung stehen, sollen im folgenden Kapitel diskutiert werden (Kapitel 4.3). Auf ökologische Strategien, die sich zur Kontrolle von Aphelidien-Infektionen in industriellen Mikroalgenkulturen aus den gewonnenen Erkenntnissen ableiten lassen, wird am Ende des Kapitels ebenfalls näher eingegangen (Kapitel 4.4).

### 4.1 Charakterisierung der Algeninfektion mit *A. protococcarum* AI15TR

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Charakterisierung von *A. protococcarum* AI15TR diskutiert. Dabei wird zunächst auf die Identifikation des Stammes als *A. protococcarum* eingegangen (Hypothese I a). Anschließend wird das Wirtsspektrum von *A. protococcarum* AI15TR diskutiert (Hypothese I b) und der Verlauf der Infektion bei verschiedenen Mikroalgenpezies, sowie der Einfluss der Kultivierungsumgebung auf den Infektionsverlauf erörtert (Hypothese I c).

#### 4.1.1 Identifikation von *A. protococcarum* AI15TR

Der bis dato unbekannte parasitische Wasserpilz AI15TR, der 2013 erstmalig in Tannenbaumreaktoren des Biosolarzentrums an der HS Anhalt auftrat (Matthes 2020), konnte in dieser Arbeit anhand spezifischer morphologischer und molekularer Merkmale der Spezies *Amoebophilidium protococcarum* zugeordnet werden (Abbildung 16, Abbildung 17, Abbildung A1).

Die Art *A. protococcarum* wurde in den späten 60er Jahren das erste Mal wissenschaftlich beschrieben (Gromov und Mamkaeva 1968) und sowohl die Feinstruktur des Parasiten (Gromov und Mamkaeva 1970) als auch das Wirtsspektrum (Gromov und Mamkaeva 1969) in den folgenden Jahren erstmalig untersucht. Anhand spezifischer morphologischer Merkmale und des typischen Lebenszyklus wurde in dieser Arbeit der Stamm AI15TR mittels klassischer Licht- und Fluoreszenzmikroskopie untersucht und der Gattung *Amoebophilidium* zugeordnet (Abbildung 16).

Im Jahr 1997 wurden erstmals verschiedene genetische Karyotypen der beschriebenen *A. protococcarum* Stämme (X1, X5, X31) veröffentlicht (Pinevich *et al.* 1997). Einige Jahre später wurden weitere Isolate (X5, FD95, WZ01) anhand der 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S rRNA Gen Sequenzen phylogenetisch untersucht (Letcher *et al.* 2015). Für eine speziesgenaue

Zuordnung von AI15TR wurde deshalb nach der in der Literatur bei Letcher berichteten Methode die Sequenzen der 18S- und ITS1-rRNA Gene analysiert, mit der BLASTn Datenbank abgeglichen und anschließend mit publizierten Sequenzen aus der Gruppe der Aphelidiaceae eine phylogenetische Untersuchung durchgeführt. Die BLASTn Suche, sowie die phylogenetische Einordnung im ML-Stammbaum zeigten die höchste Übereinstimmung (Identity 99-100 %) mit *A. protococcarum* FD95 und X5, sodass eine Zuordnung zur Spezies *A. protococcarum* untermauert wird (Abbildung A1).

#### 4.1.2 Pathogenität von *A. protococcarum* AI15TR

Die Pathogenität von *A. protococcarum* AI15TR wurde anhand von elf Grünalgenspezies untersucht. Dabei zeigte sich, wie typisch für Aphelidien, ein stammspezifisches Wirtsspektrum (Ding *et al.* 2017; Gromov und Mamkaeva 1969; Letcher *et al.* 2017).

Zusätzlich zu den Spezies aus der Familie Scenedesmaceae wies *A. protococcarum* AI15TR auch für die untersuchten Vertreter der Ordnung Chlorellales Pathogenität auf (Abbildung 19). In älterer Literatur werden für *A. protococcarum* Algenwirte aus der taxonomisch veralteten Gruppe der Chlorococcales beschrieben, die auch Chlorellales, umfassten, vor allem *Scenedesmus* und *Protococcus*-Arten werden als Wirte genannt (Letcher und Powell 2019). Gromov and Mamkaeva haben vier *Amoebophilidium protococcarum*-Stämme (X-1/2/3/5) an 142 *Scenedesmus*-Kulturen, 13 verschiedener Arten und verschiedener Isolationsorte getestet (Gromov und Mamkaeva 1969). Dabei wurde beobachtet, dass verschiedene *Scenedesmus*-Kulturen gegenüber keinen, einigen oder allen *Amoebophilidium*-Stämmen empfindlich oder vollständig resistent sind. Die Empfindlichkeit gegenüber den verschiedenen Parasitenstämmen war stabil und charakteristisch für jeden individuellen Algenstamm, aber nicht für alle Stämme einer Algenart. In einer aktuellen Studie wurde unter anderem das Wirtsspektrum des neu beschriebenen Stammes *A. protococcarum* WZ01 anhand von 42 Grünalgenstämmen untersucht (Ding *et al.* 2017). Die Infektionsexperimente zeigten, dass in diesem Fall zusätzlich zum Hauptwirt *Graesiella* sp. WBG-1 zwei *Chlorococcum* Stämme sehr schnell und zwei *Scenedesmus*-Stämme weniger schnell befallen werden.

Die Ergebnisse der Untersuchung der Pathogenität von AI15TR stimmen mit dem in der Literatur beschriebenen Wirtsspektrum von *Amoebophilidium* überein, unterstreichen aber nochmals, dass jeder bisher untersuchte Stamm von *A. protococcarum* ein sehr spezifisches und charakteristisches Pathogenitätsmuster aufweist.

#### 4.1.3 Virulenz von *A. protococcarum* AI15TR

Eine Möglichkeit der quantitativen Untersuchung von infektiösen Abläufen, die über die Pathogenität, also das Potential eine Wirtsspezies zu infizieren hinaus geht, ist die Virulenz. Sie beschreibt den Befallsgrad oder die Schwere der Schädigung, die ein Pathogen einem Wirtsorganismus zufügt. Im Fall von Aphelidien-Infektionen wird hier nicht die Schädigung an einem Individuum betrachtet, da eine erfolgreiche Infektion einer Algenzelle durch *A. protococcarum* nicht nur zur Schädigung, sondern zum Absterben dieser einzelnen Zelle führt. Stattdessen wird in dieser Arbeit eine Algenpopulation als Ganzes betrachtet und beurteilt, wie stark diese durch den Parasiten über eine festgesetzte Zeit im Vergleich zu gesunden Kontrollkulturen geschädigt wird. Dazu wurden die TS, sowie die OD<sub>750</sub> und die E<sub>685</sub> als Parameter des Algenzustandes herangezogen, da diese Parameter sich gut zur Charakterisierung der Vitalität von Algenkulturen eignen, um die Virulenz von *A. protococcarum* indirekt zu bestimmen.

Zur ersten Ermittlung der Pathogenität von *A. protococcarum* AI15TR wurde lediglich die Virulenz bezogen auf die TS ermittelt (Abbildung 19). Die Virulenz war bei Vertretern der Familie Scenedesmaceae am stärksten ausgeprägt, wobei nur die Kulturen der beiden kokkoiden Stämme *S. vacuolatus* und *T. wisconsinensis* innerhalb von wenigen Tagen völlig zerstört wurden (100 % Virulenz). Die Infektion von *S. obliquus*- und *D. quadricauda*-Kulturen fiel verzögert aus und deshalb wurde innerhalb desselben Zeitraumes eine abgeschwächte Virulenz festgestellt. Auch bei *C. sorokiniana* und *P. kessleri*-Kulturen war die Virulenz in derselben Zeitspanne deutlich geringer. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass mit wachsender phylogenetischer Distanz zur Wirtsalge *S. vacuolatus* die Virulenz von *A. protococcarum* AI15TR gegenüber der Infektion sinkt. Welches mit der verwandtschaftlichen Distanz zusammenhängende ‚Merkmal‘ letztendlich für die unterschiedlichen Reaktionen verantwortlich ist, stellt eine zu diskutierende Frage dar. Der Mechanismus, mit welchem Aphelidien ihre Wirtszellen erkennen, sich an die Zellwand anheften und diese mit einem Keimtubus durchbrechen, ist bisher biochemisch noch nicht hinreichend untersucht. In älteren Veröffentlichungen wird berichtet, dass bei den Gattungen *Aphelidium* und *Pseudaphelidium* ein Pseudopodium nach Anheften an die Algenzelle entlang der Algenoberfläche wächst und die Infektion über einen schon vorhandenen Bruch oder Spalt in der Zellwand stattfindet (Gromov und Mamkaeva 1975; Schweikert und Schnepf 1997). Mit den ständig wachsenden Erkenntnissen zu biochemischer Interaktion von Pathogensystemen durch Omics-Technologien erscheint ein rein physikalischer Mechanismus unwahrscheinlich. Die zahlreichen Befunde, dass verschiedene Aphelidien-Stämme hochspezifische Pathomuster aufweisen, sprechen ebenfalls gegen einen generellen Mechanismus. Bei der verwandten Gruppe der Rozelliden wurden zwei wichtige Faktoren für die Infektion identifiziert,

die bei anfälligen Arten der Wirtsgattung *Allomyces* auftreten: ein lösliches Exsudat, das Rozella-Zoosporen anlockt, sowie ein Rezeptor auf der Zellwandoberfläche des Wirtsorganismus, der bewirkt, dass Rozella-Zoosporen haften bleiben und unmittelbar danach enzystieren und auskeimen. Die verwandte, aber nicht empfängliche Art *Blastocladia emersonii* zieht ebenfalls Rozella-Zoosporen an, Zoosporen können sich aber nur in sehr begrenztem Umfang an sie anlagern (Held 1974). Diese Ergebnisse legen nahe, dass viele Algenspezies spezifische Sporen anlocken, aber passende Algenzellen noch vor der Anheftung über Oberflächenproteine als Wirt identifiziert werden. Andere Algenarten oder -Stämme, die aufgrund ihrer Oberflächenproteine nicht in das über evolutionäre Vorgänge erlernte ‚Beuteschema‘ der Sporen passen, werden nicht infiziert.

Diese Hypothese würde zu der Beobachtung passen, dass Aphelidien-Stämme derselben Art, die an verschiedenen Orten isoliert wurden, verschiedene Wirtsspektren aufweisen, je nachdem mit welchen Algenarten/-stämmen sie in ihrer natürlichen Umgebung über viele Generationen hin Kontakt hatten (Gromov und Mamkaeva 1969; Letcher *et al.* 2017). Auch eine generelle Beobachtung, dass die Infektion mit zunehmenden Generationszyklen im Verlauf der letzten fünf Jahre immer schneller bei denselben Wirtsspezies verläuft, lassen darauf schließen, dass sich der Parasit zunehmend an den präsentierten Wirt anpasst. Dieser Befund wird von der generellen Annahme unterstützt, dass sich Parasiten mit kurzen Generationszeiten schneller entwickeln als ihre Wirte und so Resistenzstrategien der Wirte schnell überwinden. Dieser Prozess kann zu einer lokalen Anpassung führen, bei der eine Parasitenpopulation eine höhere durchschnittliche Virulenz auf lokalen Wirtspopulationen aufweist, als gegenüber fremden Populationen (Kaltz und Shyhoff 1998; Lively und Dybdahl 2000). Ähnliche Adaptionsmechanismen wurden kürzlich bei Chytridien festgestellt und liefern gleichzeitig den experimentellen Beweis, dass die genetische Vielfalt in Wirtspopulationen eine erhöhte Resistenz gegen eine Infektion verleiht, indem sie die Anpassung der Parasiten behindert (Agha *et al.* 2018).

## 4.2 Mikrobielle Gemeinschaft in infizierten Mikroalgenkulturen

Zur Erörterung der mikrobiellen Gemeinschaft in infizierten Mikroalgenkulturen wird zunächst auf die beobachteten Unterschiede der bakteriellen Gemeinschaften bei vier Mikroalgenpezies eingegangen (Hypothese II a). Anschließend wird der Einfluss von Kultivierungsumgebung diskutiert (Hypothese II b), sowie die Auswirkung der Aphelidien-Infektion der bakteriellen Mikrobiome erörtert (Hypothese II c).

### 4.2.1 Wirtsalgenspezifische Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft

In früheren Studien wurde die Zusammensetzung von Bakteriengemeinschaften, die mit verschiedenen Algenwirten assoziiert sind, vor allem von Proteobakterien, sowie Bacteroidetes und Actinobakterien dominiert (Fulbright et al., 2019; Geng, Sale, et al., 2016; Krohn-Molt et al., 2013; Lakaniemi, Intihar, et al., 2012; Ramanan et al., 2015). Auf Phylum-Ebene stimmten diese Ergebnisse mit den Beobachtungen dieser Arbeit überein (Tabelle A1). Es besteht allerdings kein Konsens über die Spezifität dieser Assoziation auf niedrigeren taxonomischen Ebenen (Ramanan et al. 2015; Sapp et al. 2007). Die Ergebnisse der bakteriellen Zusammensetzung deuten darauf hin, dass die bakteriellen Mikrobiome auch auf Gattungsebene sehr deutlich an die jeweilige Algenpezies angepasst sind (Abbildung 26). Obwohl die meisten Bakteriengattungen bei mehreren verschiedenen Algenarten vorkamen, fanden wir für jede Algenart unterschiedliche und stabile Abundanz-Muster. Diese Ergebnisse unterstützen die Idee eines spezifischen Kernmikrobioms mit einer engen Beziehung zu seinem Algenwirt, wie für die Algenpezies *Chlorella saccharophila*, *Desmodesmus quadricauda* und *Micrasterias crux-melitensis* (Krohn-Molt et al. 2017), sowie für *Botryococcus braunii*, *Chlorella vulgaris* und *Nannochloris sp.* beschrieben (Ramanan et al. 2015). Auch für Diatomeen-Bakterien-Gemeinschaften konnten langfristige stabile Assoziationen unter kontrollierten Laborbedingungen beobachtet werden (Crenn et al. 2018). Rekrutierungsexperimente konnten an verschiedenen Phytoplantonspezies zeigen, dass die Wirtsspezies einen größeren Einfluss auf die Zusammensetzung des Mikrobioms hat als Umweltbedingungen und über Dutzende von Generationen erhalten blieb (Jackrel et al. 2021). Auch in natürlichen Umgebungen wurden genus-spezifische Abundanzmuster mit distinkten Mikroalgenpezies beobachtet (Krug et al. 2020). Es wird vermutet, dass spezifische bakterielle Funktionen, wie beispielsweise die Förderung des Algenwachstums, für die Etablierung und Erhaltung einer stabilen Assoziation in der nährstoffreichen Phykosphäre von wesentlicher Bedeutung sind und über längere Zeiträume zu einer möglichen Co-Evolution der Partner führen können (Ramanan et al. 2015).

#### 4.2.2 Auswirkung der Kultivierungsumgebung auf die bakterielle Gemeinschaft

Über die Wirtsspezifität hinaus wird diskutiert, ob assoziierte Mikrobiome in künstlichen Algenkulturen aus dem beprobten Habitat stammen und möglicherweise über Jahre hinweg in Stammkultursammlungen konserviert werden oder ob Bakterien neu in axenische Stammkulturen eindringen, während unsterile Upscaling-Verfahren durchgeführt werden.

Unsere Ergebnisse zeigen von Beginn der Experimente an persistente wirtsspezifische Mikrobiome, unabhängig der offenen oder sterilen Handhabung. Vorkulturen aus der KASC Stammsammlung wurden bei der Versuchsvorbereitung und beim Up-Scaling steril in der Laminar-Flowbox oder mit Kontakt zur offenen Umgebung gehandhabt, so dass die Einwanderung neuer Bakterienstämme in offenen Kulturumgebung möglich war. Die Kultivierung unter offenen Bedingungen hatte keinen Einfluss auf das Algenwachstum und in den meisten Fällen nur einen geringen Einfluss auf die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft (Abbildung 25, Abbildung 26). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Invasion von nicht algenspezifischen Bakterien in schon besiedelte und assoziierte Mikrobiome wenig erfolgreich ist. Die Aufrechterhaltung des bakteriellen Kernmikrobioms deutet auf ein hohes Maß an Anpassung gegenüber dem spezifischen Holobionten hin. Die Ergebnisse mehrerer Langzeitstudien im Freiland deuten ebenfalls auf die Persistenz eines Kernmikrobioms hin, beobachten aber im Gegensatz zu unseren relativ kurzen Experimentalzeiten zusätzlich saisonale Veränderungen (Biondi *et al.* 2017) oder Veränderungen von Teilen der Gemeinschaft über die Wachstumsphasen der Algen hinweg (Fulbright *et al.* 2018; Geng *et al.* 2016a). Beim Vergleich von Isolaten aus natürlichen Lebensräumen und Langzeitkulturen aus Stammsammlungen konnte für die Kieselalgen *Asterionellopsis glacialis* und *Nitzschia longissima* gezeigt werden, dass die Kultivierung unter Laborbedingungen eine spezifische, aber vereinfachte mikrobielle Gemeinschaft selektiert (Behringer *et al.* 2018). Obwohl geringe Unterschiede zwischen den Isolaten aus verschiedenen Habitaten gefunden wurden, war die Zusammensetzung auf Gattungsebene über die Dauer von einem Jahr hoch konserviert. All diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass bakterielle Gattungen mit einer Wirtsalge auf Speziesebene und über zeitliche Skalen hinweg konsistent assoziiert sind. Eine weitere Studie konzentrierte sich auf die Frage, wie Assemblierungsprozesse von bakteriellen Gemeinschaften der Mikroalgen-Phyosphäre von *Phaeodactylum tricornutum* und *Microchloropsis salina* in Open Ponds und Laboranreicherungen organisiert sind (Kimbrel *et al.* 2019). Die Ergebnisse verdeutlichen, dass algenassoziierte Bakteriengemeinschaften nicht nur durch deterministische Prozesse wie Interaktionen mit dem Algen-Holobionten und Kultivierungsbedingungen geformt werden, wie in unserer Studie berichtet, sondern auch durch stochastische Prozesse wie die anfängliche Zusammensetzung des Algenmikrobioms beeinflusst werden.



#### 4.2.3 Auswirkung der Aphelidien-Infektion auf die bakterielle Gemeinschaft

Die Auswirkungen sporenbildender Parasiten in industriellen Algenkultivierungssystemen sind bisher nur unzureichend untersucht worden, obwohl ähnliche Wechselwirkungen aus der natürlichen Umwelt hinlänglich bekannt sind (Frenken *et al.* 2017; Gerphagnon *et al.* 2013b; Grossart *et al.* 2016). Nicht nur das Algenwachstum wurde durch die Infektion gestört, sondern auch die bakterielle Gemeinschaft war von diesem Prozess deutlich betroffen. Die bakterielle Diversität nahm im Verlauf der Aphelidien-Infektion zu (Abbildung 23) und die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft hatte sich sowohl hinsichtlich der Struktur (Abbildung 24, Abbildung 25) und der abgeleiteten Funktionen deutlich verändert. Bakterielle Funktionen, die mit dem Abbau von Biomasse zusammenhängen, wurden in infizierten Algenkulturen häufiger gefunden als in nicht infizierten Kulturen (Abbildung 28).

Es gibt einige Berichte darüber, dass die Zusammensetzung von Bakteriengemeinschaften durch Antibiotikabehandlung und andere bioaktive Substanzen beeinflusst werden (Geng *et al.* 2016b), aber insgesamt sind nur sehr wenige Informationen verfügbar, die sich speziell auf die Auswirkungen von Algenparasiten auf assoziierte mikrobielle Gemeinschaften in industriellen Kultursystemen konzentrieren. Eine Studie von Carney und Kollegen (2014) beobachtete die Dynamik des Mikrobioms in einer Mikroalgen-Massenkultur, die in einem kommunalen Abwasser-Photobioreaktor kultiviert wurde. Diese Studie berichtete über einen Rückgang der Algenbiomasse durch Chytridien-Parasitose, die wiederum mit einer Verschiebung der Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft von  $\gamma$ -Proteobakterien zu Bacteroidetes einherging (Carney *et al.* 2014). Diese Ergebnisse stützen die Hypothese (II b), dass sich parasitäre Infektionen nicht nur auf die jeweilige Wirtsalge auswirken, sondern auch die zugehörige mikrobielle Gemeinschaft stark beeinflussen. Bislang sind biochemische Interaktionen zwischen Algen, Parasiten und dem vernetzten Mikrobiom für die anfängliche Invasion der Aphelidien spärlich beschrieben, daher ist weitere Forschung erforderlich, um zu verstehen, wie Algen geschützt und/oder die Infektion der Aphelidien durch die Interaktionen zwischen Algen und Bakterien gestört oder geschwächt werden können (McBride *et al.* 2016).

Diese Arbeit zeigte darüber hinaus, dass sich auch die funktionellen Merkmale der assoziierten Mikrobiome von algenkooperativen hin zu zersetzenden Funktionen verschiebt (Abbildung 28). Dies könnte auf die Zunahme von abgestorbenen und so bioverfügbar gewordener Algenbiomasse, die von den Aphelidien freigesetzt wurde, zurückzuführen sein. Unsere Ergebnisse zum funktionellen Potential wurden anhand der FAPROTAX Datenbank bestimmt. FAPROTAX wandelt taxonomische mikrobielle Gemeinschaftsprofile in potentielle Funktionsprofile auf der Grundlage der in einer Probe identifizierten Taxa um (Louca *et al.* 2016) und hat sich für ein schnelles funktionales Screening bewährt (Sansupa *et al.* 2021).

Dennoch sind die Ergebnisse stark vom Umfang und Aktualität der taxonomischen und funktionalen Referenzdatenbanken abhängig und können im Vergleich mit proteomischen oder transkriptomischen Analysen immer nur ein funktionelles Potential der gefundenen Spezies und keine tatsächliche funktionelle Aktivität darstellen. Deshalb wurden im nächsten Kapitel die Interaktionsmuster während der Aphelidien-Infektion auf Proteinebene untersucht und im Detail diskutiert.

### 4.3 Metaproteom-Analyse von infizierten Mikroalgenkulturen

Um ein tieferes Verständnis der komplexen Interaktionsmuster während einer Aphelidien-Infektion in Mikroalgenkulturen zu erlangen, wird zunächst auf die Veränderungen der Proteinmustern von Algen und Pilzen eingegangen (Hypothese III a). Anschließend werden Veränderungen im bakteriellen Metaproteom diskutiert und mögliche biologische Zusammenhänge der Verschiebung der Interaktionsmuster beleuchtet (Hypothese III b).

#### 4.3.1 Interaktion von *S. vacuolatus* und *A. protocoocarum* auf Proteinebene

Wie in den vorhergehenden Experimenten gezeigt und auch aus der Literatur berichtet (Ding *et al.* 2021; Höger *et al.* 2021; Letcher *et al.* 2013), wurde ein sehr schnelles Absterben der *Scenedesmus*-Zellen aufgrund der Aphelidien-Infektion beobachtet (Abbildung 31). Darüber hinaus wurden in den infizierten Algenkulturen erhebliche Veränderungen der taxonomischen Verteilung der PGs festgestellt (Abbildung 32). Algenproteine nahmen während Infektion der Algenpopulation kontinuierlich ab, wohingegen die pilzliche Proteine vier Tage nach der Infektion ihren Höhepunkt erreichten und dann bis zum siebten Tag abflachten. Dieser zeitliche Ablauf der Expression der Pilzproteine stimmt mit dem veröffentlichten Reproduktionszyklus von *A. protocoocarum* nach Letcher *et al.* (2013) überein. Ein Aphelidien-Zyklus, der das Eindringen in die Wirtszellen, die Phagozytose des Wirtszytosplasmas und die Reifung der Sporen umfasst, kann innerhalb von ca. zwei Tagen ablaufen (Ding *et al.* 2021; Letcher *et al.* 2013). Da die Algenkulturen in den hier aufgeführten Experimenten mit einem hohen Anteil an Aphelidien-Inokulum (6,6 Vol.-%) infiziert wurden, wird angenommen, dass nur wenige Zyklen nacheinander erforderlich sind, um die gesamte Algenpopulation zu infizieren und abzutöten. In nicht infizierten, gesunden Algenkulturen zeigten sich im Gegensatz dazu eine hohe Stabilität der eukaryotischen und bakteriellen Proteinmuster, sowohl hinsichtlich der taxonomischen Verteilung sowie in der Proteinhäufigkeit (Abbildung 32, Abbildung 33). Kleinere Verschiebungen in den eukaryotischen Proteinmustern wurden zum Ende der Inkubationszeit beobachtet. Diese Veränderungen lassen sich durch einen anfänglichen Alterungsprozess der Algenzellen erklären, der durch entstehende Nährstofflimitierungen im Medium entsteht. Algenpopulationen in Batch-Kulturen, denen also über die Zeit keine neuen Nährstoffressourcen zugeführt werden, unterliegen durch aufkommenden Nährstoff-limitationen metabolischen Veränderungen, die zu Anpassungen des Stoffwechsels der Algen führen (Humby *et al.* 2013; Longworth *et al.* 2016; Shang *et al.* 2017).

Darüber hinaus konnten nur wenige überexprimierte Proteine in infizierten Kulturen gefunden werden, die typischerweise mit der pflanzlichen Abwehr von Pilzpathogenen assoziiert werden (Tabelle A5). Ein Beispiel dafür stellen LRR-RLKs dar, die eine wichtige Rolle im pflanzlichen Abwehrmechanismus darstellen, indem sie die Anwesenheit von Pathogenen detektieren und

Signale weiterleiten, die eine weitere Abwehrreaktion vermitteln (Singh und Singh 2018). Das LRR6-Rezeptorprotein, dessen erhöhte Abundanz in infizierten Kulturen beobachtet wurde, könnte folglich möglicherweise an der Erkennung des Aphelid-Pathogens beteiligt sein. Darüber hinaus wurde eine erhöhte Häufigkeit der Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase detektiert, die den Stoffwechsel von Pflanzen während einer Pilz- oder Bakterieninfektion beeinflussen kann (Mahmood *et al.* 2006; Mehta *et al.* 2008). Zudem wurden ABC-Transporterproteine gefunden, die nach einer Infektion hochreguliert sind. ABC-Transporter stellen einen wichtigen und vielfältigen Faktor für pathogene Infektionen von Pflanzen dar, indem sie zum einen den Parasiten vor pflanzlichen antimykotischen Molekülen schützen, sowie für die Sekretion von Pilzsekundärmetaboliten verantwortlich sind, die die Pflanzenabwehr abschwächen (Abou Ammar *et al.* 2013). Eine kürzlich erschienene Studie zum Pathosystem *Graesiella emersonii*–*Amoebophilidium protococcarum* identifizierte über eine Transkriptionsanalyse Elemente der Abwehrreaktion von *G. emersonii* sowie Bestandteile der Infektionstätigkeit von *A. protococcarum* (Ding *et al.* 2021). Beim Mikroalgen-Wirt wurden mit der Expression von Abwehrgenen, die an Mustererkennungsrezeptoren, Hitzeschockproteinen und Enzymen zum Abfangen von reaktivem Sauerstoff beteiligt sind, ähnliche Abwehrreaktionen wie bei höheren Pflanzen gefunden. Für die Infektion von *A. protococcarum* scheinen besonders Gene, die mit Pathogen-Wirt-Interaktionen zusammenhängen, sowie Stoffwechselwege, die mit der Modulation des Vakuolentransportes verbunden sind, eine wichtige Rolle einzunehmen. Im Vergleich mit den von Ding *et al.* (2021) veröffentlichten Datensets, konnten nur oberflächliche Übereinstimmungen mit den Ergebnissen dieser Untersuchung gefunden werden. Diese Abweichungen lassen sich einerseits dadurch erklären, dass im Vergleich zur Studie von Ding *et al.* (2021) spätere Zeitpunkte der Infektion untersucht wurden. So konnten hier die ersten Interaktionen (null bis drei Tage nach Kontakt) zu denen vor allem das Erkennen des Pathogens und erste Abwehrreaktionen durch die Alge, sowie das Überwinden dieser Reaktionen durch den Pilz gehören, nicht erfasst werden. Des Weiteren wurden grundlegend verschiedene Methoden zur Untersuchung der Infektionsabläufe angewandt, sodass sich Daten auf Proteom- und Transkriptionsebene nur schlecht direkt vergleichen lassen. Bisher sind abgesehen von der kürzlich erschienenen Studie von Ding *et al.* (2021) keine Informationen zum Ablauf der Infektion von Grünalgen durch *Amoebophilidium protococcarum* auf molekularbiologischer Ebene veröffentlicht worden. Die in dieser Arbeit beschriebenen Daten weisen folglich, insbesondere durch die zusätzliche Integration des assoziierten bakterielle Konsortiums in das Pathosystem *S. vauiolatus* – *A. protococcarum* einen hohen Neuheitsgrad auf.

#### 4.3.2 Reaktion der bakteriellen Mikroalgen-Gemeinschaft auf die Aphelidien-Infektion von *S. vacuolatus*

Algenwachstum ohne Aphelidien wurde nur von einer geringen Veränderung der bakteriellen Proteinmuster begleitet (Abbildung 33). Der Effekt der eintretenden Seneszenz der Algenpopulation hat demzufolge keine tiefgreifenden Auswirkungen auf die Interaktionen mit der assoziierten bakteriellen Gemeinschaft.

Im Gegensatz dazu wurde ein starker Anstieg der Anzahl bakterieller Proteine im Verlauf der Aphelidien-Infektion im Vergleich zu nicht infizierten Kulturen beobachtet (Abbildung 33), was auf eine Anpassung des bakteriellen Mikrobioms an die veränderten äußeren Bedingungen in der absterbenden Algenkultur hinweist. Auch die Proteinabundanzen der bakteriellen Gemeinschaft veränderten sich stark durch die Infektion (Abbildung 33). Proteine, die ohne Infektion hoch abundant waren, nahmen während einer Infektion schnell ab, und eine andere Gruppe von Proteinen, die unter gesunden Bedingungen nur sehr selten vorkam, nahm stark zu, sobald die Algen von Aphelidien infiziert wurden und abstarben. Bei der Untersuchung der Zusammensetzung des assoziierten Mikrobioms wurden ebenfalls Veränderungen in Abhängigkeit der Aphelidien-Infektion festgestellt (Höger et al. 2021), so dass vermutet wird, dass die Veränderung der Funktionsprofile sich sowohl auf die Verschiebung der Zusammensetzung, sowie des Stoffwechsels im assoziierten bakteriellen Mikrobiom zurückführen lässt. Insgesamt wurden 423 bakterielle Proteine detektiert, die im Vergleich von gesunden und infizierten Kulturen signifikant unterschiedlich exprimiert wurden (Abbildung 35). Die Proteine mit den am stärksten veränderten Expressionsmustern waren hauptsächlich verschiedenen Stoffwechselfunktionen zuzurechnen, was darauf hindeutet, dass die assoziierten Bakterien ihren Stoffwechsel anpassen, um neue Nährstoffe aus der absterbenden Algenbiomasse verarbeiten zu können (Abbildung 36). So wurde beispielsweise die Protease Pfpl in infizierten Kulturen hochreguliert, die den Abbau kleiner Peptide erleichtert. Es wurde außerdem eine erhöhte Abundanz von Proteinen des verzweigt-kettigen ABC-Transportsystems gefunden, das für die Aufnahme einer Vielzahl kleiner Moleküle, einschließlich Aminosäuren, Metallionen und Zucker verwendet wird (Schneider und Hunke 1998). Außerdem wurden mehrere Enzyme gefunden, die die Biosynthese von Aminosäuren wie Cystein, Leucin, Arginin und Pyrimidinen katalysieren. Die Umwandlung von Acetat in Acetyl-CoA wurde hochreguliert, um Energie und biosynthetische Komponenten über den Tricarbonsäurezyklus bzw. den Glyoxylat-Shunt zu erzeugen. Andererseits wurden viele Proteine, deren Funktionen mit Translation, Transkription und posttranslationalen Modifikationen zusammenhängen, mit niedrigeren Häufigkeiten gefunden, was darauf hindeutet, dass Anpassungen bei zellulären Prozessen und der Signalgebung in infizierten Kulturen weniger wichtig waren.

Es wurde außerdem eine höhere Abundanz mehrerer Proteine festgestellt, die mit bakteriellen pathogenen Interaktionen in Pflanzenwirten in Verbindung gebracht werden (Tabelle 4A). Ein Beispiel dafür ist das äußere Membranprotein A (OmpA). Die Beteiligung von OmpA an der Pathogenese verschiedener Pflanzen wurde für die Bakterienarten *Ralstonia solanacearum* und *Xanthomonas axonopodis* berichtet (Asolkar und Ramesh 2020; Athinuwat und Brooks 2019). Es konnte gezeigt werden, dass die OmpA-vermittelte Invasion für die Proteinsekretion während der Infektion entscheidend ist. Außerdem wurde festgestellt, dass Proteine aus der Familie der Histidinkinasen in infizierten Kulturen hochreguliert sind. Sensor-Histidin-Kinasen wurden als wesentlicher Faktor für die hypersensible Reaktion und das Pathogenitätstyp-III-Sekretionssystem von *Burkholderia glumae* auf Reispflanzen beschrieben (Karki *et al.* 2012). Des Weiteren wurden vermehrt bakterielle Transpeptidase-Transglykosylasen in infizierten Kulturen gefunden, die als neuartiger Virulenzfaktor von *Pseudomonas savastanoi* in Olivenästen identifiziert wurde (Matas *et al.* 2012).

Diese Ergebnisse stützen die Theorie, dass die Beziehung zwischen Mikroalgen und dem assoziierten Mikrobiom zum einen stark vom Algenwirt aber auch von externen Umweltbedingungen beeinflusst wird (Cirri und Pohnert 2019). Gesundes Algenwachstum ist durch stabile Algen-Bakterien-Interaktionsmuster gekennzeichnet, kann aber durch Umweltstörungen wie Nährstofflimitationen oder Pathogeninfektionen stark beeinträchtigt werden. Ähnliche Veränderungen wurden auch für andere Pflanzen-Bakterien-Gemeinschaften oder das Humanmikrobiom beschrieben (Casadevall und Pirofski 2000; Cheng *et al.* 2019; Vogel *et al.* 2016). Verschiedene Auslöser wie Umweltveränderungen, toxische Chemikalien, Chemotherapeutika, Nährstoffschwankungen sowie Resistenzen oder Immunschwächen des Wirtes können symbiotische Mikroben dazu bringen pathogen für Ihren Wirt zu werden (Hurst 2016). Ähnlich wurde in dieser Arbeit beobachtet, dass sich algenassoziierte Bakterien, die unter gesunden Wachstumsbedingungen kommensalistische oder mutualistische Interaktionen zum Mikroalgenwirt pflegen, opportunistisch reagieren, sobald die Algen von Aphelidien angegriffen werden. Sie tragen dann dazu bei, verletzte oder abgestorbene Algenzellen und verbleibende Zellbestandteile zu zersetzen. Der Wechsel zu einer pathogenen Lebensweise könnte auf der Zerstörung der strukturellen Integrität der Algenzellen durch das Eindringen von Aphelidien beruhen. Algenexsudate, die attraktive Nährstoffe oder stressinduzierte Effektoren enthalten, werden freigesetzt und triggern pathogene bakterielle Eigenschaften. Andererseits kann verletzte oder abgestorbene Algenbiomasse auch direkt zersetzt werden, was saprotrophe Funktionen einiger Bakterien begünstigt.

#### 4.4 Präventive Strategien zur Kontrolle von Aphelidien-Infektionen

Abschließend wurde untersucht welche präventiven Strategien sich dazu eignen die Auswirkung einer Infektion mit *A. protocoocarum* AI15TR in Mikroalgen-Kulturen zu minimieren. Zunächst wird auf die Auswirkung der Steigerung der Algendiversität auf die Stabilität der Kultur während der Infektion eingegangen (Hypothese IV a). Des Weiteren wird der Einfluss von Anpassungen des abiotischen Kultivierungsregimes (Hypothese IV b) sowie eine biotische Kontrolle mittels Co-Kultivierung mit protektiven Bakterien diskutiert (Hypothese IV c) und mögliche Gründe für die Verzögerung des Infektionsverlaufes durch die einzelnen Parameter erörtert.

##### 4.4.1 Diversitätssteigerung in Polykulturen

Trotz erheblicher Schwierigkeiten Invasionen durch schädliche Mikroorganismen zu vermeiden, stellt die Kultivierung von Monokulturen nach wie vor den Normalfall in der Mikroalgenzucht dar (Araújo *et al.* 2021; Borowitzka 2018; Olaizola und Grewe 2019). Experimentelle Studien haben in den letzten Jahren jedoch eindrucksvoll das Potenzial von Multispezies-Algenkulturen aufgezeigt sowohl die Biomasseproduktion, Lipidproduktivität und das Nährstoffrecycling zu verbessern, als auch die Nachhaltigkeit der Kultivierungssysteme optimieren zu können (Beyter *et al.* 2016; Carruthers *et al.* 2019; Lage *et al.* 2021; Newby *et al.* 2016; Olofsson *et al.* 2019; Shurin *et al.* 2014; Stockenreiter *et al.* 2012). Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Diversitätsversuche bestätigen, dass mit nicht infizierten Polykulturen ähnlich gute Wachstumsparameter wie in Monokulturen erzielt werden konnten (Abbildung 39). In gesunden Polykulturen pendelte sich unter gleichbleibenden Kultivierungsparametern außerdem nach wenigen Tagen eine stabile Verteilung der beteiligten Algenarten ein (Abbildung 40). Im Vergleich zur *S. vacuolatus*-Monokultur konnte nur ein kleiner Überschuss in einigen nicht infizierten Polykulturen beobachtet werden. Der Grund dafür könnte darin liegen, dass die Standard-Kultivierungsparameter auf die Analyse von Aphelidien-Infektionen in Kulturen des Hauptwirtes *S. vacuolatus* ausgerichtet ist. Bei einem Kultivierungssystem, das auf maximalen Biomassezuwachs optimiert ist, würden sich eventuell andere Arten-Verteilungen und auch stärkere Produktivitätssteigerungen durch die Artenzusammensetzungen ergeben.

Des Weiteren war die Virulenz der Aphelidien in infizierten Polykulturen im Vergleich zu Monokultur deutlich vermindert (Abbildung 39) und die relativen Verhältnisse der Zellzahlen wurden durch die Infektion anfälliger Algenarten erheblich umstrukturiert (Abbildung 40). Es konnte allerdings kein direkter Diversitätseffekt in dem Sinne beobachtet werden, dass mit steigenden Artzahlen die Algenkulturen generell weniger stark von der Infektion betroffen waren. Es scheint eine starke Konservierung der Virulenz für die einzelnen Algenstämme

vorzuliegen: Die gemessene Virulenz einer Polykultur entsprach in etwa dem Durchschnitt der Virulenz der einzelnen an der Polykultur beteiligten Arten. Die Verringerung der Virulenz hing also von der Kombination der Algenspezies und weniger vom reinen Artenreichtum ab. Bei einer Infektion kam es durch das Vorhandensein weiterer Arten nicht zu einer Verzögerung oder Abschwächung der Infektion von *Scenedesmus*-Zellen, sondern zu einer Kompensation des Wachstums der anderen beteiligten Arten, die das wegfallende Wachstum von *S. vacuolatus* zeitweise ausgeglichen haben.

Andere Untersuchungen zeigen, dass eine Erhöhung des Artenreichtums in Algenkulturen die verfügbaren ökologischen Nischen besser ausfüllt, was nicht nur zu einer hohen Produktivität, sondern auch zu einer geringeren Invasivität durch unerwünschte Stämme und einer geringeren Anfälligkeit für Algenpathogene führt (Nalley *et al.* 2014; Smith und Crews 2014). Unter anderem wurde von Cho *et al.* (2017) in einem Hochdurchsatz-Algenpond (HRAP) zur Behandlung kommunaler Abwässer gezeigt, dass sich die Algengemeinschaft an ungünstige Umweltbedingungen durch eine Erhöhung der Diversität anpasst. Verschiedene Mikroalgenstämme dominierten unter verschiedenen Bedingungen und eine Kombination der Stämme trägt dazu bei die Algengemeinschaft vor Umwelt- und Räuberdruck zu schützen (Cho *et al.* 2017). Godwin und Kollegen (2017) konnten demonstrieren, dass in Polykulturen die Stabilität der Biomasseproduktion, der Öl-Ertrag und besonders die Resistenz gegen Invasionen im Vergleich zu Monokulturen erhöht waren (Godwin *et al.* 2017). Dieses Ergebnis wird von weiteren Untersuchungen gestützt, die davon berichten, dass der negative Effekt von räuberischem Zooplankton in Polykulturen mit steigender Artenzahl deutlich weniger stark und langanhaltend ausfällt als bei Monokulturen (Corcoran und Boeing 2012). Außerdem wird empfohlen die Komplementarität der eingesetzten Polykulturen zu maximieren, da dies die höchste Biomasseproduktion und Resilienz zur Folge hat. (Roelke 2017). Funktionelle Diversität der Algenspezies kann die Stabilität bei Umweltveränderungen erhöhen (Mattsson *et al.* 2021), eine Komplementarität der Ressourcennutzung die Wahrscheinlichkeit des Wettbewerbs zwischen den Algenarten/-stämmen herabsetzen und unterschiedliche Zellgrößen/-Formen sowie Zellphysiologie verringern die Anfälligkeit für spezifische Pathogene (Hamilton und Rossmeissl 2014).



#### 4.4.2 Anpassung der abiotischen Kultivierungsparameter

Im Gegensatz zur Zusammensetzung des Kulturmediums hatten Temperatur-, Beleuchtungs- sowie Begasungsregime einen größeren Einfluss auf den Infektionsverlauf (Tabelle 21).

Die Erhöhung der Umgebungstemperatur führte, wie erwartet zu einer schnelleren Infektion durch den Parasiten und somit zu einer schnelleren Zerstörung der Algenzellen (Abbildung 42). Eine moderate Erhöhung der Kultivierungstemperatur von 23,5 auf 30 °C begünstigt die Wachstumsrate von *Scenedesmus*-Spezies nur marginal (Li *et al.* 2011). Für Aphelidien sind bisher keine Untersuchungen der Infektionsrate in Abhängigkeit der Temperatur bekannt, allerdings gibt es für eine Reihe von Chytridien Hinweise darauf, dass die Temperatur einen wichtigen Faktor darstellt (van Donk 1989). Barr und Hickman (1967) berichteten, dass unter 10 °C keine Infektion von *Spirogyra* durch das Chytridium *Rhizophyidium sphaerocarpum* auftritt und die optimale Temperatur für die Infektion im Labor bei 30 °C erreicht wird (Barr und Hickman 1967). Im Lake Manitoba tritt *Chytridium deltanum* erst ab einer Wassertemperatur von über 25 °C auf (Masters 1971). Andererseits gibt es auch viele sporenbildenden Algenparasiten, die hauptsächlich während niedrigeren Temperaturen im Winter oder Frühling auftreten, in Abhängigkeit der natürlichen Verbreitung und Auftreten der Wirtsalge (Blinn und Button 1973; van Donk und Ringelberg 1983). Wenn also sowohl *S. vacuolatus* als auch *A. protococcarum* von einer moderaten Erhöhung der Umgebungstemperatur im Wachstum begünstigt werden, wird die Temperaturerhöhung letztendlich für den Parasiten zum Vorteil. Da Aphelidien generell eine höhere exponentielle Wachstumsrate aufweisen, profitieren sie von einer leichten Erhöhung der Wachstumsrate deutlich stärker als Algen.

Die Einführung einer Dunkelphase hatte nur einen geringen Einfluss auf die Infektionskennzahlen im Vergleich zur Standard-Dauerbeleuchtung. Wurde die Dunkelphase zusätzlich mit einer CO<sub>2</sub>-Begasung kombiniert, konnte hingegen eine deutliche Verzögerung des Infektionsablaufes beobachtet werden (Tabelle 21). Die Dunkelphase führte dazu, dass für 10 h die Abgabe von Sauerstoff durch die Algen aussetzt und der restliche Sauerstoff durch die einsetzende Zellatmung verbraucht wird. Da durch die mit 1 % CO<sub>2</sub> gemischte Druckluft allerdings weiter Sauerstoff ins Medium eingetragen wird, konnte so allein keine anoxische Umgebung erzeugt werden. Dieser Zustand kann nur erreicht werden, wenn man die 10 h Dunkelphase mit einer Begasung mit 100 % CO<sub>2</sub> kombiniert, sodass kein zusätzlicher Sauerstoff mehr in die Kultur eingetragen wird. Die nächtliche anoxische Phase führte zu einer Erstickung der eukaryotischen Aphelidien, die den Sauerstoff für die Zellatmung benötigen, und verlangsamte somit entscheidend den Fortgang der Infektion. Dabei wird auch die Zellatmung und somit das Wachstum der Algen in der Dunkelphase eingeschränkt, im Gegensatz zu den Aphelidien können die Algen diesen Nachteil in der 14 h Hellphase ausgleichen. Eine ähnliche CO<sub>2</sub>-Asphyxiation konnte bisher erfolgreich zur biologischen

Kontrolle von Zooplankton wie Wasserflöhen (*Cladocera*), Rädertierchen (Rotifera), und Ruderfußkrebse (Copepoda) eingesetzt werden (Montemezzani et al. 2017). Auch durch Entgasung des Mediums mit Stickstoff konnten anoxischen Bedingungen während der Dunkelphase erreicht und zur Kontrolle von Wimpertierchen eingesetzt werden (Troschl et al. 2017).

#### 4.4.3 Co-Kultivierung mit bakteriellen Protektorstämmen

Für die Co-Kulturen mit den aus *S. vacuolatus*-Kulturen isolierten Bakterienstämmen *Sphingopyxis terrae*, *Pseudoxanthomonas* sp. und *Rhizobium wuzhouense* konnte keine Auswirkung auf den Infektionsprozess beobachtet werden. Durch die Zugabe von *Pseudomonas protegens* jedoch wurde die Aphelidien-Infektion sehr deutlich verzögert (Tabelle 22).

Obwohl die isolierten Bakterienstämme anhand ihrer starken Assoziation zu Pflanzen oder Algen ausgewählt wurden, hat keine dieser co-kultivierten Arten einen Einfluss auf die Aphelidien-Infektion genommen. In der Literatur wird postuliert, dass durch die Aufrechterhaltung einer ‚gesunden‘ Mikrobiota Nischen, die von schädlichen Arten ausgenutzt werden könnten, anderweitig besetzt würden (Fisher et al. 2019). Das assoziierte und mutualistische Mikrobiom scheint die Wirtsalge zwar vor der Migration neuer, potentiell weniger kooperativer Bakterienstämme zu schützen (Kapitel 4.2.2), gegen einen spezialisierten, sehr virulenten Parasiten können die ausgewählten Vertreter des natürlichen Mikrobioms jedoch nichts ausrichten.

Durch die Co-Kultivierung von *S. vacuolatus* mit *P. protegens* konnten über einen Zeitraum von 14 Tagen alle Anzeichen einer Infektion verhindert werden (Abbildung 44), sowie eine um 93 ( $V_{750}$ ) bzw. 68 ( $V_{685}$ ) Prozentpunkte verminderte Virulenz im Vergleich zur Standardbehandlung beobachtet werden. Die Minderung im Wachstum ist dabei auf die Interaktion mit den Begleitbakterien zurückzuführen, und nicht auf eine Schädigung der Kultur durch Aphelidien, da innerhalb von 14 Tagen auch mikroskopisch keine Anzeichen einer Aphelidien-Infektion gefunden werden konnten. Die Kultivierung als Batch-Versuch führte in *Scenedesmus*-Kulturen schon nach dem vierten Tag zu einer Stickstofflimitierung, sodass auch in nicht infizierten Kulturen nach spätestens ca. 14 Tagen eine Stagnation des Algenwachstums auftrat. Nach Ablauf der 14 Tage konnten sich in infizierten Kulturen Aphelidien gegen die im Wachstum limitierten Algen und Bakterien durchsetzen, sodass letztendlich eine stark verzögerte Infektion auftrat. Daraus konnte eine deutliche Verzögerung der Infektion um 365 % abgeleitet werden (Tabelle 22). Die Wirkung von *P. protegens* gegen pilzliche Pathogene wird im Wesentlichen auf den antimikrobiellen Wirkstoff DAPG zurückgeführt. Bisher werden fluoreszierende Pseudomonaden vor allem in der Landwirtschaft

---

zur biologischen Kontrolle von Pflanzenpathogenen eingesetzt (Buddrus-Schiemann 2008) und die Wirkung gegen Algenpathogene wurde bisher nur für die Braunalge *Saccharina latissima* beschrieben (Nagel *et al.* 2012). Ein gezielter Einsatz gegen Algenpathogene ist bisher nicht bekannt.

Obwohl es zahlreiche Publikationen gibt, die positive Effekte von algen-assoziierten Bakterien auf Mikroalgenkulturen beschreiben (Cho *et al.* 2015; Lian *et al.* 2018) und Methoden der synthetischen Ökologie theoretisch schon länger als vielversprechenden Alternativen im präventivem Kontaminationsmanagement diskutiert werden (Fisher und Lane 2019; Kazamia *et al.* 2012a; McBride *et al.* 2016; Mooij *et al.* 2015; Shurin *et al.* 2013), gibt es bisher nur wenige praktische Berichte über künstlich zusammengestellte Mikrobiome als präventive Strategie gegen Algenpathogene. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass algenassoziierte mikrobielle Konsortien so zusammengestellt werden können, dass sie vor dem Abweiden durch Rädertiere schützen (Fisher *et al.* 2019) und eine Co-Kultur mit bestimmten Bakterien eine vollständige virale Lyse von *Chaetoceros tenuissimus* verhindern kann (Kimura und Tomaru 2014).

## 5 Fazit und Ausblick

In diesem Kapitel werden die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit zusammengeführt und im Hinblick auf anfänglich formulierten Hypothesen (1.6) in einem biologischen Kontext besprochen, sowie jeweils in einem Ausblick gedanklich weitergeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten wesentliche Charakteristika der Infektion mit dem 2013 im Biosolarzentrum aufgetretenen parasitischen Wasserpilz festgestellt werden. Das unbekanntes Algenpathogen wurde eindeutig der Spezies *Amoebophilidium protococcarum* zugeordnet. Wie andere Aphelidien weist *A. protococcarum* Al15TR ein sehr spezifisches Pathogenitätsmuster auf, wobei mit wachsender phylogenetischer Distanz zum Hauptwirt *S. vacuolatus* die Virulenz sinkt. Von der Kultivierungsumgebung blieb der Infektionsablauf hingegen weitestgehend unverändert. Um ein umfassendes Verständnis der Pathogenität von *A. protococcarum* und nah verwandter Aphelidien-Arten über die mikroskopische Ebene hinaus zu erlangen, würden zusätzliche Untersuchungen der Abläufe der Infektion auf molekularbiologischer Ebene beitragen. Untersuchungen zur Anpassungsfähigkeit der Parasiten an neue Wirtsalgen stellen ein weiteres wichtiges Forschungsfeld dar. Ein tiefergehendes Verständnis über Pathogenitätsmuster und zugrundeliegenden Mechanismen der Infektion würden bedeutend dazu beitragen präventive Strategien zur Kontaminationskontrolle zu optimieren und die Übertragbarkeit auf andere Parasiten zu verbessern.

Die Untersuchung bakterieller Algengemeinschaften verschiedener nicht infizierter Mikroalgenpezies bestätigte die Assoziation von spezifischen und stabilen Kernmikrobiomen. In mit Aphelidien infizierten Kulturen wurde nicht nur das Algenwachstum gestört, sondern auch die bakterielle Gemeinschaft von diesem Prozess deutlich beeinflusst, während die Kultivierungsumgebung nur einen marginalen Einfluss ausübt. Während der Infektion wurde das bakterielle Mikrobiom sowohl hinsichtlich der Zusammensetzung als auch der potentiellen Funktionen deutlich verändert. Funktionen, die mit dem Abbau von Biomasse assoziiert sind, wurden bei Bakterien in infizierten Algenkulturen häufiger gefunden. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass sich parasitäre Infektionen nicht nur auf die Algenpopulation auswirken, sondern auch die zugehörige mikrobielle Gemeinschaft stark beeinflussen. Aufbauend auf den Erkenntnissen aus dieser Arbeit, würde eine Analyse der Reaktion des nativen Mikrobioms in Mikroalgenkulturen auf parasitische Infektionen unter realistischen Produktionsbedingungen über längere Zeit dabei helfen tiefere Einblicke in Assoziation von Mikroalgen und mikrobiellen Gemeinschaften zu erlangen. Außerdem bedarf es weiterer Forschung, um zu verstehen, ob durch gezielte Beeinflussung des Mikrobioms wiederum der Ablauf von parasitischen Infektionen beeinflusst werden kann.

Eine metaproteomische Analyse konnte einen deutlichen Rückgang eukaryotischer Proteine sowie ein Peak pilzlicher Proteine am vierten Tag im Vergleich von infizierten zu gesunden *S. vacuolatus*-Kulturen nachweisen. Allerdings wurden dabei nur wenige Proteine gefunden, die typischerweise mit der pflanzlichen Abwehr von Pilzpathogenen in Verbindung gebracht werden. Gleichzeitig wurde ein starker Anstieg der Anzahl bakterieller Proteine im Verlauf der Apheliden-Infektion im Vergleich zu gesunden Kulturen festgestellt. Ein Großteil der überexprimierten bakteriellen Proteine ließ sich verschiedenen Stoffwechselfunktionen zuordnen, was darauf hindeutet, dass das bakterielle Konsortium seinem Stoffwechsel anpasst, um die freiwerdenden Nährstoffe der infizierten Algenpopulation verarbeiten zu können. Algenassoziierte Bakterien, die unter gesunden Wachstumsbedingungen synergistische Beziehungen mit ihrem Mikroalgenwirt pflegen, verhalten sich im Fall einer Infektion der Algenpartner opportunistisch. Sie tragen bei einer Infektion mit dazu bei verletzte oder abgestorbene Algenzellen und verbleibende Zellbestandteile zu zersetzen. Wie schon in Bezug auf die Pathogenität von Aphelidien erwähnt, würde eine Analyse der ersten Reaktionen des Algen-Aphelidien-Pathogensystems nach Kontakt der Organismen auf Transkriptom/Proteom-Ebene sehr zu einem generellen Verständnis der Infektion und somit zur Verbesserung nachhaltiger Verhinderungsstrategien beitragen.

Die Ergebnisse der Behandlungsexperimente enthalten wichtige Erkenntnisse für die nachhaltige Gestaltung von Algenkultivierungssystemen. Es konnte gezeigt werden, dass Aphelidien-Infektionen durch eine präventive Anpassung abiotischer Kultivierungsfaktoren ausgebremst werden. Die Kultivierungstemperatur sollte dafür am unteren Ende des Temperaturoptimums der eingesetzten Algenarten ausgerichtet werden und anoxische Dunkelphasen eingeführt werden. Des Weiteren bestätigen die Ergebnisse, dass auch biotische Interaktionen einen deutlichen Einfluss auf Verlauf auf Aphelidien-Infektionen haben. Sie unterstützen die Hypothese, dass diverse Polykulturen über einen längeren Zeitraum eine stabilere Produktion als Monokulturen bieten. Auch durch den Einsatz sorgfältig ausgewählter bakterieller Konsortien ist darüber hinaus eine Verbesserung der Stabilität von Mikroalgenkulturen möglich ist. Der Einsatz von protektiven Bakterien gegen schädliche Invasoren stellt in der Algenbiotechnologie noch einen sehr neuen und wenig erforschten Ansatz dar. Die Entdeckung und Untersuchung neuer potenzieller Protektorstämmen, sowie ihrer antimikrobiellen Wirkstoffe bieten ein breites Forschungsfeld mit großem Potential einen Beitrag zur Stabilisierung von Mikroalgenkulturen zu leisten. Für zukünftige Forschungsarbeiten zur Kontrolle von Aphelidien-Infektionen sollten die in dieser Arbeit untersuchten präventiven Strategien kombiniert und im technischen Maßstab über langen Zeitraum getestet werden. Für eine industriennahe Anwendung sollte die Zusammenstellung der Polykultur auf einen spezifischen Verwendungszweck (z. B. Biomasseproduktion oder

---

Lipidausbeute) mit funktionell komplementären Algenspezies abzielen. Die Co-Kultur der Algenpolykultur mit *P. protegens* sollte hinsichtlich ihrer Zusammensetzung und interspezifischen Interaktionen mittels metatranskriptomischer und metaproteomischer Analysen beobachtet werden. Eine Optimierung der abiotischen Kultivierungsparameter, die gleichzeitig ein stabiles Wachstum der Algen-Bakterien-Kulturen gewährleistet und Aphelidien-Infektion möglichst verzögert, kann die Stabilität auf lange Zeit weiter unterstützen. Dazu sollte eine optimale Nährstoffzusammensetzung für Algen-Bakterien Co-Kulturen gewährleistet sein und sowie eine Anpassung der minimalen optimalen Temperatur erfolgen. Des Weiteren könnte die Länge und Induktion der anoxischen Dunkelphase durch alternative Gase (CO<sub>2</sub> vs. Stickstoff) optimiert werden. Eine Verlängerung der durch die bakteriellen antimikrobiellen Stoffe geschützten Phase kann durch eine limitationsminimierte Kultivierung in semi-batch oder kontinuierlichen Kultivierungsverfahren erreicht werden. Des Weiteren sollte untersucht werden, inwieweit sich die beschriebenen Methoden auf andere Algenparasiten übertragen lassen. Generell ist von einer guten Übertragbarkeit der untersuchten Behandlungsmethoden auf andere eukaryotische Algenpathogene im Besonderen auf andere Aphelidien-Stämme, auszugehen, da nicht auf spezifischen Eigenschaften des untersuchten Stammes AI15TR abgezielt wird, sondern generelle Eigenschaften im Fokus der Behandlung stehen.

Die Optimierung der Massenkultivierung von Mikroalgen erfordert einen interdisziplinären Ansatz, der die Anwendung ökologischer Prinzipien für die Gestaltung produktiver, resistenter und widerstandsfähiger Algengemeinschaften nutzt. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse bilden eine vielversprechende Grundlage für Entwicklung von präventiven Strategien im Kontaminationsmanagement und verdeutlichen, dass ökologische Verfahren zur Kontrolle von aggressiven parasitischen Infektionen in Mikroalgenkulturen beitragen können.

## 6 Verzeichnisse

### 6.1 Literaturverzeichnis

Abou Ammar, G.; Tryono, R.; Döll, K.; Karlovsky, P.; Deising, H. B.; Wirsal, S. G. R. (2013): Identification of ABC transporter genes of *Fusarium graminearum* with roles in azole tolerance and/or virulence. In: *PLoS ONE* 8 (11), e79042. DOI: 10.1371/journal.pone.0079042.

Agha, R.; Gross, A.; Rohrlack, T.; Wolinska, J. (2018): Adaptation of a chytrid parasite to its cyanobacterial host is hampered by host intraspecific diversity. In: *Frontiers in Microbiology* 9, S. 921. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00921.

Amann, R. I.; Ludwig, W.; Schleifer, K.-H. (1995): Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. In: *Microbiological Reviews* 59 (1), S. 143–169.

Amavizca, E.; Bashan, Y.; Ryu, C.-M.; Farag, M. A.; Bebout, B. M.; de-Bashan, L. E. (2017): Enhanced performance of the microalga *Chlorella sorokiniana* remotely induced by the plant growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and *Bacillus pumilus*. In: *Scientific Reports* 7 (1), S. 41310. DOI: 10.1038/srep41310.

Amin, S. A.; Hmelo, L. R.; van Tol, H. M.; Durham, B. P.; Carlson, L. T.; Heal, K. R. *et al.* (2015): Interaction and signalling between a cosmopolitan phytoplankton and associated bacteria. In: *Nature* 522 (7554), S. 98–101. DOI: 10.1038/nature14488.

Anand, V.; Singh, P. K.; Banerjee, C.; Shukla, P. (2017): Proteomic approaches in microalgae: perspectives and applications. In: *3 Biotech* 7 (3), S. 197. DOI: 10.1007/s13205-017-0831-5.

Araújo, R.; Vázquez Calderón, F.; Sánchez López, J.; Azevedo, I. C.; Bruhn, A.; Fluch, S. *et al.* (2021): Current status of the algae production industry in Europe: An emerging sector of the blue bioeconomy. In: *Frontiers in Marine Science* 7. DOI: 10.3389/fmars.2020.626389.

Argelaguet, R.; Velten, B.; Arnol, D.; Dietrich, S.; Zenz, T.; Marioni, J. C. *et al.* (2018): Multi-Omics Factor Analysis—a framework for unsupervised integration of multi-omics data sets. In: *Molecular systems biology* 14 (6), e8124. DOI: 10.15252/msb.20178124.

Arumugam, M.; Raes, J.; Pelletier, E.; Le Paslier, D.; Yamada, T.; Mende, D. R. *et al.* (2011): Enterotypes of the human gut microbiome. In: *Nature* 473 (7346), S. 174–180. DOI: 10.1038/nature09944.

Asolkar, T.; Ramesh, R. (2020): The involvement of the type six secretion system (T6SS) in the virulence of *Ralstonia solanacearum* on brinjal. In: *3 Biotech* 10 (7), S. 324. DOI: 10.1007/s13205-020-02311-4.

Athinuwat, D.; Brooks, S. (2019): The OmpA gene of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* is involved in pathogenesis of pustule disease on soybean. In: *Current Microbiology* 76 (7), S. 879–887. DOI: 10.1007/s00284-019-01702-y.

Atkinson, G. F. (1909): Some fungus parasites of algae. In: *Botanical Gazette* 48 (5), S. 321–338. Online verfügbar unter <http://www.jstor.org/stable/2467454>.

Azam, F. (1998): Microbial control of oceanic carbon flux: The plot thickens. In: *Science* 280, S. 694–696. DOI: 10.1126/science.280.5364.694.

- Azam, F.; Malfatti, F. (2007): Microbial structuring of marine ecosystems. In: *Nature Reviews Microbiology* 5 (10), S. 782–791. DOI: 10.1038/nrmicro1747.
- Baldassano, S. N.; Bassett, D. S. (2016): Topological distortion and reorganized modular structure of gut microbial co-occurrence networks in inflammatory bowel disease. In: *Scientific Reports* 6, S. 26087. DOI: 10.1038/srep26087.
- Barberán, A.; Bates, S. T.; Casamayor, E. O.; Fierer, N. (2012): Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities. In: *The ISME journal* 6 (2), S. 343–351. DOI: 10.1038/ismej.2011.119.
- Barr, D. J. S.; Hickman, C. J. (1967): Chytrids and algae: II. Factors influencing parasitism of *Rhizophyidium shaerocarpum* on *Spirogyra*. In: *Canadian Journal of Botany* 45 (4), S. 431–440. DOI: 10.1139/b67-043.
- Bauman, J.; Wiegant, J.; Borst, P.; van Duijn, P. (1980): A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochrome-labelled RNA. In: *Experimental Cell Research* 128 (2), S. 485–490. DOI: 10.1016/0014-4827(80)90087-7.
- Beaulieu, L. (2019): Insights into the Regulation of Algal Proteins and Bioactive Peptides Using Proteomic and Transcriptomic Approaches. In: *Molecules* 24 (9). DOI: 10.3390/molecules24091708.
- Behringer, G.; Ochsenkühn, M. A.; Fei, C.; Fanning, J.; Koester, J. A.; Amin, S. A. (2018): Bacterial communities of diatoms display strong conservation across strains and time. In: *Frontiers in Microbiology* 9, S. 659. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00659.
- Ben Amor, F.; Elleuch, F.; Ben Hlima, H.; Garnier, M.; Saint-Jean, B.; Barkallah, M. *et al.* (2017): Proteomic analysis of the chlorophyta *Dunaliella* new strain AL-1 revealed global changes of metabolism during high carotenoid production. In: *Marine Drugs* 15 (9). DOI: 10.3390/md15090293.
- Benderliev, K. M.; Pouneva, I.; Ivanova, N. (1993): Fungicide effect of Triton-N on *Phlyctidium*. In: *Biotechnology Techniques* 7 (5), S. 335–338.
- Benjamini, Y.; Hochberg, Y. (1995): Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. In: *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)* 57 (1), S. 289–300. DOI: 10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x.
- Bertani, G. (1951): Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. In: *Journal of bacteriology* 62 (3), S. 293–300. DOI: 10.1128/jb.62.3.293-300.1951.
- Beyter, D.; Tang, P.-Z.; Becker, S.; Hoang, T.; Bilgin, D.; Lim, Y. W. *et al.* (2016): Diversity, productivity, and stability of an industrial microbial ecosystem. In: *Applied and Environmental Microbiology* 82 (8), S. 2494–2505. DOI: 10.1128/AEM.03965-15.
- Biondi, N.; Cheloni, G.; Tatti, E.; Decorosi, F.; Rodolfi, L.; Giovannetti, L. *et al.* (2017): The bacterial community associated with *Tetraselmis suecica* outdoor mass cultures. In: *Journal of Applied Phycology* 29 (1), S. 67–78. DOI: 10.1007/s10811-016-0966-5.
- Bischoff, H. W.; Bold, H. C. (1963): Phycological studies IV: Some soil algae from enchanted rock and related algal species. Austin, Texas: University of Texas Publications (Phycological studies, IV).



- Bižić-Ionescu, M.; Zeder, M.; Ionescu, D.; Orlić, S.; Fuchs, B. M.; Grossart, H.-P.; Amann, R. (2015): Comparison of bacterial communities on limnic versus coastal marine particles reveals profound differences in colonization. In: *Environmental Microbiology* 17 (10), S. 3500–3514. DOI: 10.1111/1462-2920.12466.
- Blinn, D. W.; Button, K. S. (1973): The effect of temperature on parasitism of *Pandorina* sp. by *Dangeadia mammilla* B. Schröder in an arizona mountain lake. In: *Journal of phycology* 9 (3), S. 323–326. DOI: 10.1111/j.1529-8817.1973.tb04099.x.
- Borowitzka, M. (2018): Commercial-Scale production of microalgae for bioproducts. In: Stéphane La Barre und Stephen S. Bates (Hg.): *Blue Biotechnology*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, S. 33–65.
- Borowitzka, M. A. (2013): High-value products from microalgae - their development and commercialisation. In: *Journal of Applied Phycology* 25 (3), S. 743–756. DOI: 10.1007/s10811-013-9983-9.
- Borowitzka, M. A.; Moheimani, N. R. (Hg.) (2013a): *Algae for biofuels and energy*. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Borowitzka, M. A.; Moheimani, N. R. (2013b): Sustainable biofuels from algae. In: *Mitig Adapt Strateg Glob Change* 18 (1), S. 13–25. DOI: 10.1007/s11027-010-9271-9.
- Bratbak, G.; Thingstad, T. F. (1985): Phytoplankton-bacteria interactions: an apparent paradox? Analysis of a model system with both competition and commensalism. In: *Marine Ecology* (25), S. 23–30. DOI: 10.3354/meps025023.
- Brennan, L.; Owende, P. (2010): Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. In: *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14 (2), S. 557–577. DOI: 10.1016/j.rser.2009.10.009.
- Brown, M. B. (1975): A method for combining non-independent, one-sided tests of significance. In: *Biometrics* 31 (4), S. 987. DOI: 10.2307/2529826.
- Bruckner, T.; Bashmakov, I. A.; Mulugetta, Y.; Chum, H.; de la Vega Navarro, A.; Edmonds, J. et al. (2014): Energy systems. In: *Climate change 2014: Mitigation of climate change*. Contribution of working group III to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Capter 7. Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA: Cambridge University Press.
- Bruhn, J. B.; Gram, L.; Belas, R. (2007): Production of antibacterial compounds and biofilm formation by *Roseobacter* species are influenced by culture conditions. In: *Applied and Environmental Microbiology* 73 (2), S. 442–450. DOI: 10.1128/AEM.02238-06.
- Brune, D. E.; Lundquist, T. J.; Benemann, J. R. (2009): Microalgal biomass for greenhouse gas reductions: potential for replacement of fossil fuels and animal feeds. In: *Journal of Environmental Engineering* 135 (11), S. 1136–1144. DOI: 10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0000100.
- Brunk, C. F.; Li, J.; Avaniss-Aghajani, E. (2002): Analysis of specific bacteria from environmental samples using a quantitative polymerase chain reaction. In: *Current Issues in Molecular Biology* (4), S. 13–18.

- Buchan, A.; LeClerc, G. R.; Gulvik, C. A.; González, J. M. (2014): Master recyclers: features and functions of bacteria associated with phytoplankton blooms. In: *Nature Reviews Microbiology* 12 (10), S. 686–698. DOI: 10.1038/nrmicro3326.
- Büchel, C.; Wilhelm, C.; Wagner, V.; Mittag, M. (2017): Functional proteomics of light-harvesting complex proteins under varying light-conditions in diatoms. In: *Journal of plant physiology* 217, S. 38–43. DOI: 10.1016/j.jplph.2017.06.007.
- Buddrus-Schiemann, K. E. M. (2008): Wirkung des biologischen Pflanzenstärkungsmittels Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*) auf das Wachstum von Gerste (*Hordeum vulgare* L. cv. Barke) und auf die bakterielle Gemeinschaft in der Rhizosphäre. Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Buettner, C.; Bergen, M. von; Jehmlich, N.; Noll, M. (2019): *Pseudomonas spp.* are key players in agricultural biogas substrate degradation. In: *Scientific Reports* 9 (1), S. 12871. DOI: 10.1038/s41598-019-49313-8.
- Burge, C. A.; Kim, C. J. S.; Lyles, J. M.; Harvell, C. D. (2013): Special issue Oceans and Humans Health: The ecology of marine opportunists. In: *Microbial Ecology* 65 (4), S. 869–879. DOI: 10.1007/s00248-013-0190-7.
- Burkart, A.; Wrobel, T. J.; Räscher, A.; Rascher, U. (2014): Das Leuchten der Pflanzen. In: *Biologie in unserer Zeit* 44 (3), S. 182–186. DOI: 10.1002/biuz.201410537.
- Calhoun, S.; Bell, T. A. S.; Dahlin, L. R.; Kunde, Y.; LaButti, K.; Louie, K. B. *et al.* (2021): A multi-omic characterization of temperature stress in a halotolerant *Scenedesmus* strain for algal biotechnology. In: *Communications biology* 4 (1), S. 333. DOI: 10.1038/s42003-021-01859-y.
- Cao, J.-Y.; Kong, Z.-Y.; Zhang, Y.-F.; Ling, T.; Xu, J.-L.; Liao, K. *et al.* (2019): Bacterial community diversity and screening of growth-affecting bacteria from *Isochrysis galbana* following antibiotic treatment. In: *Frontiers in Microbiology* 10, S. 994. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00994.
- Carney, L. T.; Lane, T. W. (2014): Parasites in algae mass culture. In: *Frontiers in Microbiology* 5, S. 278. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00278.
- Carney, L. T.; Reinsch, S. S.; Lane, P. D.; Solberg, O. D.; Jansen, L. S.; Williams, K. P. *et al.* (2014): Microbiome analysis of a microalgal mass culture growing in municipal wastewater in a prototype OMEGA photobioreactor. In: *Algal Research* 4, S. 52–61. DOI: 10.1016/j.algal.2013.11.006.
- Carney, L. T.; Sorensen, K. (2015): Methods for treating a culture of hematococcus pluvialiy for contamination using hydrogen peroxide. Angemeldet durch Heliae Development, LCC, Gilbert, AZ am 25.08.2015. Anmeldenr: 14/667,917. Veröffentlichungsnr: US 9,113,607 B1.
- Carney, L. T.; Wilkenfeld, J. S.; Lane, P. D.; Solberg, O. D.; Fuqua, Z. B.; Cornelius, N. G. *et al.* (2016): Pond Crash Forensics: Presumptive identification of pond crash agents by next generation sequencing in replicate raceway mass cultures of *Nannochloropsis salina*. In: *Algal Research* 17, S. 341–347. DOI: 10.1016/j.algal.2016.05.011.
- Carruthers, D. N.; Godwin, C. M.; Hietala, D. C.; Cardinale, B. J.; Lin, X. N.; Savage, P. E. (2019): Biodiversity improves life cycle sustainability metrics in algal biofuel production. In: *Environmental science & technology* 53 (15), S. 9279–9288. DOI: 10.1021/acs.est.9b00909.

- Casadevall, A.; Pirofski, L. A. (2000): Host-pathogen interactions: basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. In: *Infection and immunity* 68 (12), S. 6511–6518. DOI: 10.1128/IAI.68.12.6511-6518.2000.
- Cassan, F. D.; Coniglio, A.; Amavizca, E.; Maroniche, G.; Cascales, E.; Bashan, Y.; de-Bashan, L. E. (2021): The *Azospirillum brasilense* type VI secretion system promotes cell aggregation, biocontrol protection against phytopathogens and attachment to the microalgae *Chlorella sorokiniana*. In: *Environ Microbiol* 23 (10), S. 6257–6274. DOI: 10.1111/1462-2920.15749.
- Chang, E.; Weinstock, C.; Zhang, L.; Charlab, R.; Dorff, S. E.; Gong, Y. *et al.* (2021): FDA approval summary: Enfortumab vedotin for locally advanced or metastatic urothelial carcinoma. In: *Clinical cancer research* 27 (4), S. 922–927. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-20-2275.
- Cheng, Y. T.; Zhang, L.; He, S. Y. (2019): Plant-microbe interactions facing environmental challenge. In: *Cell host & microbe* 26 (2), S. 183–192. DOI: 10.1016/j.chom.2019.07.009.
- Chisti, Y. (2008): Biodiesel from microalgae beats bioethanol. In: *Trends in Biotechnology* 26 (3), S. 126–131. DOI: 10.1016/j.tibtech.2007.12.002.
- Cho, D.-H.; Choi, J.-W.; Kang, Z.; Kim, B.-H.; Oh, H.-M.; Kim, H.-S.; Ramanan, R. (2017): Microalgal diversity fosters stable biomass productivity in open ponds treating wastewater. In: *Scientific Reports* 7 (1), S. 1979. DOI: 10.1038/s41598-017-02139-8.
- Cho, D.-H.; Ramanan, R.; Heo, J.; Lee, J.; Kim, B.-H.; Oh, H.-M.; Kim, H.-S. (2015): Enhancing microalgal biomass productivity by engineering a microalgal-bacterial community. In: *Bioresource Technology* 175, S. 578–585. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.10.159.
- Cirri, E.; Pohnert, G. (2019): Algae-bacteria interactions that balance the planktonic microbiome. In: *New Phytologist* 223 (1), S. 100–106. DOI: 10.1111/nph.15765.
- Clement, B. G.; Kehl, L. E.; DeBord, K. L.; Kitts, C. L. (1998): Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities. In: *Journal of Microbiological Methods* 31 (3), S. 135–142. DOI: 10.1016/S0167-7012(97)00105-X.
- Cooper, M. B.; Smith, A. G. (2015): Exploring mutualistic interactions between microalgae and bacteria in the omics age. In: *Current Opinion in Plant Biology* 26, S. 147–153. DOI: 10.1016/j.pbi.2015.07.003.
- Corcoran, A. A.; Boeing, W. J. (2012): Biodiversity increases the productivity and stability of phytoplankton communities. In: *PLoS ONE* 7 (11), e49397. DOI: 10.1371/journal.pone.0049397.
- Corcoran, A. A.; Saunders, M. A.; Hanley, A. P.; Lee, P. A.; Lopez, S.; Ryan, R.; Yohn, C. B. (2018): Iterative screening of an evolutionary engineered *Desmodesmus* generates robust field strains with pesticide tolerance. In: *Algal Research* 31, S. 443–453. DOI: 10.1016/j.algal.2018.02.026.
- Crenn, K.; Duffieux, D.; Jeanthon, C. (2018): Bacterial epibiotic communities of ubiquitous and abundant marine diatoms are distinct in short- and long-term associations. In: *Frontiers in Microbiology* 9, S. 2879. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02879.

- Croft, M. T.; Lawrence, A. D.; Raux-Deery, E.; Warren, M. J.; Smith, A. G. (2005): Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. In: *Nature* 438 (7064), S. 90–93. DOI: 10.1038/nature04056.
- Danchin, A.; Braham, S. (2017): Coenzyme B12 synthesis as a baseline to study metabolite contribution of animal microbiota. In: *Microbial Biotechnology* 10 (4), S. 688–701. DOI: 10.1111/1751-7915.12722.
- Day, J. G.; Thomas, N. J.; Achilles-Day, U. E. M.; Leakey, R. J. G. (2012): Early detection of protozoan grazers in algal biofuel cultures. In: *Bioresource Technology* 114, S. 715–719. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.03.015.
- de-Bashan, L. E.; Bashan, Y. (2008): Joint immobilization of plant growth-promoting bacteria and green microalgae in alginate beads as an experimental model for studying plant-bacterium interactions. In: *Applied and Environmental Microbiology* 74 (21), S. 6797–6802. DOI: 10.1128/AEM.00518-08.
- de-Bashan, L. E.; Bashan, Y.; Moreno, M.; Lebsky, V. K.; Bustillos, J. J. (2002): Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell and population size of the microalgae *Chlorella* spp. when co-immobilized in alginate beads with the microalgae-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. In: *Canadian Journal of Microbiology* 48 (6), S. 514–521. DOI: 10.1139/w02-051.
- de-Bashan, L. E.; Mayali, X.; Bebout, B. M.; Weber, P. K.; Detweiler, A. M.; Hernandez, J.-P. et al. (2016): Establishment of stable synthetic mutualism without co-evolution between microalgae and bacteria demonstrated by mutual transfer of metabolites (NanoSIMS isotopic imaging) and persistent physical association (Fluorescent in situ hybridization). In: *Algal Research* 15, S. 179–186. DOI: 10.1016/j.algal.2016.02.019.
- Deeks, E. D. (2019): Polatuzumab Vedotin: First Global Approval. In: *Drugs* 79 (13), S. 1467–1475. DOI: 10.1007/s40265-019-01175-0.
- Deviram, G.; Mathimani, T.; Anto, S.; Ahamed, T. S.; Ananth, D. A.; Pugazhendhi, A. (2020): Applications of microalgal and cyanobacterial biomass on a way to safe, cleaner and a sustainable environment. In: *Journal of Cleaner Production* 253, S. 119770. DOI: 10.1016/j.jclepro.2019.119770.
- Di Caprio, F. (2020): Methods to quantify biological contaminants in microalgae cultures. In: *Algal Research* 49, S. 101943. DOI: 10.1016/j.algal.2020.101943.
- Diller, C.; Castañeda-Zárata, M.; Johnson, S. D. (2019): Generalist birds outperform specialist sunbirds as pollinators of an African Aloe. In: *Biology letters* 15 (7), S. 20190349. DOI: 10.1098/rsbl.2019.0349.
- Ding, Y.; Peng, X.; Wang, Z.; Wen, X.; Geng, Y.; Li, Y. (2017): Isolation and characterization of an endoparasite from the culture of oleaginous microalga *Graesiella* sp. WBG-1. In: *Algal Research* 26, S. 371–379. DOI: 10.1016/j.algal.2017.08.003.
- Ding, Y.; Wang, Z.; Wang, Y.; Geng, Y.; Wen, X.; Li, Y. (2021): Physiological and dual transcriptional analysis of microalga *Graesiella emersonii*-*Amoebophilium protococcarum* pathosystem uncovers conserved defense response and robust pathogenicity. In: *International journal of molecular sciences* 22 (23). DOI: 10.3390/ijms222312847.
- Edgar, R. C. (2004): MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. In: *Nucleic acids research* 32 (5), S. 1792–1797. DOI: 10.1093/nar/gkh340.

- Edgar, R. C. (2010): Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 26 (19), S. 2460–2461. DOI: 10.1093/bioinformatics/btq461.
- Edgar, R. C. (2016): UNOISE2: improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon sequencing.
- Edgar, R. C. (2017): UNBIAS: An attempt to correct abundance bias in 16S sequencing, with limited success.
- Edgar, R. C. (2018a): UNCROSS2: identification of cross-talk in 16S rRNA OTU tables.
- Edgar, R. C. (2018b): Updating the 97% identity threshold for 16S ribosomal RNA OTUs. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 34 (14), S. 2371–2375. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty113.
- Egan, S.; Fernandes, N. D.; Kumar, V.; Gardiner, M.; Thomas, T. (2014): Bacterial pathogens, virulence mechanism and host defence in marine macroalgae. In: *Environmental Microbiology* 16 (4), S. 925–938. DOI: 10.1111/1462-2920.12288.
- Enzing, C.; Ploeg, M.; Barbosa, M.; Sijtsma, L.; Vigani, M.; Parisi, C.; Rodriguez Cerezo, E. (2014): Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe. Luxembourg: Publications Office.
- Evans, C.; Wilson, W. H. (2008): Preferential grazing of *Oxyrrhis marina* on virus infected *Emiliana huxleyi*. In: *Limnol Oceanogr* 53 (5), S. 2035–2040. DOI: 10.4319/lo.2008.53.5.2035.
- Faust, K.; Raes, J. (2012): Microbial interactions: from networks to models. In: *Nature reviews. Microbiology* 10 (8), S. 538–550. DOI: 10.1038/nrmicro2832.
- Faust, K.; Raes, J. (2016): CoNet app: inference of biological association networks using Cytoscape. In: *F1000Research* 5, S. 1519. DOI: 10.12688/f1000research.9050.1.
- Feng, T.-Y.; Yang, Z.-K.; Zheng, J.-W.; Xie, Y.; Li, D.-W.; Murugan, S. B. *et al.* (2015): Examination of metabolic responses to phosphorus limitation via proteomic analyses in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. In: *Scientific Reports* 5, S. 10373. DOI: 10.1038/srep10373.
- Fernández, F. G. A.; Reis, A.; Wijffels, R. H.; Barbosa, M.; Verdelho, V.; Llamas, B. (2021): The role of microalgae in the bioeconomy. In: *New biotechnology* 61, S. 99–107. DOI: 10.1016/j.nbt.2020.11.011.
- Fernández-Acero, F. J.; Amil-Ruiz, F.; Durán-Peña, M. J.; Carrasco, R.; Fajardo, C.; Guarnizo, P. *et al.* (2019): Valorisation of the microalgae *Nannochloropsis gaditana* biomass by proteomic approach in the context of circular economy. In: *Journal of proteomics* 193, S. 239–242. DOI: 10.1016/j.jprot.2018.10.015.
- Ferro, L.; Hu, Y. O.; Gentili, F. G.; Andersson, A. F.; Funk, C. (2020): DNA metabarcoding reveals microbial community dynamics in a microalgae-based municipal wastewater treatment open photobioreactor. In: *Algal Research* 51, S. 102043. DOI: 10.1016/j.algal.2020.102043.
- Fisher, C. L.; Lane, T. W. (2019): Operational, prophylactic, and linterdictive technologies for algal crop protection. In: Armin Hallmann und Pabulo H. Rampelotto (Hg.): Grand challenges in algae biotechnology. Cham: Springer International Publishing (Grand Challenges in Biology and Biotechnology), S. 35–70.
- Fisher, C. L.; Ward, C. S.; Lane, P. D.; Kimbrel, J. A.; Sale, K. L.; Stuart, R. K. *et al.* (2019): Bacterial communities protect the alga *Microchloropsis salina* from grazing by the rotifer *Brachionus plicatilis*. In: *Algal Research* 40, S. 101500. DOI: 10.1016/j.algal.2019.101500.

- Frederiksen, M.; Edwards, M.; Richardson, A. J.; Halliday, N. C.; Wanless, S. (2006): From plankton to top predators: bottom-up control of a marine food web across four trophic levels. In: *The Journal of animal ecology* 75 (6), S. 1259–1268. DOI: 10.1111/j.1365-2656.2006.01148.x.
- Frenken, T.; Alacid, E.; Berger, S. A.; Bourne, E. C.; Gerphagnon, M.; Grossart, H.-P. *et al.* (2017): Integrating chytrid fungal parasites into plankton ecology: research gaps and needs. In: *Environmental Microbiology* 19 (10), S. 3802–3822. DOI: 10.1111/1462-2920.13827.
- Fuentes, J. L.; Garbayo, I.; Cuaresma, M.; Montero, Z.; González-del-Valle, M.; Vílchez, C. (2016): Impact of microalgae-bacteria interactions on the production of algal biomass and associated compounds. In: *Marine Drugs* 14 (5), S. 100. DOI: 10.3390/md14050100.
- Fulbright, S. P.; Chisholm, S.; Reardon, K. F. (2016): Growth inhibition of *Nannochloropsis* species by *Bacillus pumilus*. In: *Algal Research* 20, S. 70–76. DOI: 10.1016/j.algal.2016.09.016.
- Fulbright, S. P.; Dean, M. K.; Wardle, G.; Lammers, P. J.; Chisholm, S. (2014): Molecular diagnostics for monitoring contaminants in algal cultivation. In: *Algal Research* 4, S. 41–51. DOI: 10.1016/j.algal.2013.11.008.
- Fulbright, S. P.; Robbins-Pianka, A.; Berg-Lyons, D.; Knight, R.; Reardon, K. F.; Chisholm, S. T. (2018): Bacterial community changes in an industrial algae production system. In: *Algal Research* 31, S. 147–156. DOI: 10.1016/j.algal.2017.09.010.
- Gachon, C. M. M.; Sime-Ngando, T.; Strittmatter, M.; Chambouvet, A.; Kim, G. H. (2010): Algal diseases: spotlight on a black box. In: *Trends in Plant Science* 15 (11), S. 633–640. DOI: 10.1016/j.tplants.2010.08.005.
- Ganeshan, G.; Manoj Kumar, A. (2005): *Pseudomonas fluorescens*, a potential bacterial antagonist to control plant diseases. In: *Journal of Plant Interactions* 1 (3), S. 123–134. DOI: 10.1080/17429140600907043.
- Ganuza, E.; Sellers, C. E.; Bennett, B. W.; Lyons, E. M.; Carney, L. T. (2016): A novel treatment protects *Chlorella* at commercial scale from the predatory bacterium *Vampirovibrio chlorellavorus*. In: *Frontiers in Microbiology* 7, S. 848. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00848.
- Geng, H.; Sale, K. L.; Tran-Gyamfi, M. B.; Lane, T. W.; Yu, E. T. (2016a): Longitudinal analysis of microbiota in microalga *Nannochloropsis salina* cultures. In: *Microbial Ecology* 72 (1), S. 14–24. DOI: 10.1007/s00248-016-0746-4.
- Geng, H.; Tran-Gyamfi, M. B.; Lane, T. W.; Sale, K. L.; Yu, E. T. (2016b): Changes in the structure of the microbial community associated with *Nannochloropsis salina* following treatments with antibiotics and bioactive compounds. In: *Frontiers in Microbiology* 7, S. 1155. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01155.
- Gerphagnon, M.; Latour, D.; Colombet, J.; Sime-Ngando, T. (2013a): A double staining method using SYTOX green and calcofluor white for studying fungal parasites of phytoplankton. In: *Applied and Environmental Microbiology* 79 (13), S. 3943–3951. DOI: 10.1128/AEM.00696-13.
- Gerphagnon, M.; Latour, D.; Colombet, J.; Sime-Ngando, T. (2013b): Fungal parasitism: life cycle, dynamics and impact on cyanobacterial blooms. In: *PLoS ONE* 8 (4), e60894. DOI: 10.1371/journal.pone.0060894.

- Gibbs, R. A.; Hayes, C. R. (1988): The use of R2A medium and the spread plate method for the enumeration of heterotrophic bacteria in drinking water. In: *Letters in Applied Microbiology* 6 (2), S. 19–21. DOI: 10.1111/j.1472-765X.1988.tb01205.x.
- Gilbert, J. A.; Steele, J. A.; Caporaso, J. G.; Steinbrück, L.; Reeder, J.; Temperton, B. *et al.* (2012): Defining seasonal marine microbial community dynamics. In: *The ISME journal* 6 (2), S. 298–308. DOI: 10.1038/ismej.2011.107.
- Gleason, F. H.; Küpper, F. C.; Amon, J. P.; Picard, K.; Gachon, C. M. M.; Marano, A. V. *et al.* (2011): Zoosporic true fungi in marine ecosystems: a review. In: *Marine and Freshwater Research* 62 (4), S. 383. DOI: 10.1071/MF10294.
- Godwin, C. M.; Hietala, D. C.; Lashaway, A. R.; Narwani, A.; Savage, P. E.; Cardinale, B. J. (2017): Ecological stoichiometry meets ecological engineering: Using polycultures to enhance the multifunctionality of algal biocrude systems. In: *Environmental science & technology* 51 (19), S. 11450–11458. DOI: 10.1021/acs.est.7b02137.
- Godwin, C. M.; Lashaway, A. R.; Hietala, D. C.; Savage, P. E.; Cardinale, B. J. (2018): Biodiversity improves the ecological design of sustainable biofuel systems. In: *GCB Bioenergy* 10 (10), S. 752–765. DOI: 10.1111/gcbb.12524.
- Grami, B.; Rasconi, S.; Niquil, N.; Jobard, M.; Saint-Béat, B.; Sime-Ngando, T. (2011): Functional effects of parasites on food web properties during the spring diatom bloom in Lake Pavin: a linear inverse modeling analysis. In: *PLoS ONE* 6 (8), e23273. DOI: 10.1371/journal.pone.0023273.
- Grivalský, T.; Střížek, A.; Příbyl, P.; Lukavský, J.; Čegan, R.; Hobza, R.; Hrouzek, P. (2021): Comparison of various approaches to detect algal culture contamination: a case study of *Chlorella* sp. contamination in a *Phaeodactylum tricornutum* culture. In: *Applied microbiology and biotechnology* 105 (12), S. 5189–5200. DOI: 10.1007/s00253-021-11396-7.
- Gromov, B. (2000): Algal parasites of the genera *Aphelidium*, *Amoebophilidium*, and *Pseudaphelidium* from Cienkowski's "Monadinea" group as representatives of a new class. Translated from *Zoologicheskii Zhurnal* 79: 517–525. In: *Entomological Review* 80, S. 26–34.
- Gromov, B.; Mamkaeva, K. A. (1968): *Amoebophilidium protococcarum* sp. n. and *Amoebophilidium chlorellavorum* sp. n.- endoparasites of protococcous algae. In: *Acta Protozoologica*, S. 224–225.
- Gromov, B.; Mamkaeva, K. A. (1969): Sensitivity of different *Scenedesmus* strains to the endoparasitic microorganism *Amoebophilidium*. In: *Phycologia* (7), S. 19–23.
- Gromov, B.; Mamkaeva, K. A. (1970): The fine structure of *Amoebophilidium protococcarum* Gromov et Mamkaeva- an endoparasite of green alga *Scenedesmus*. In: *Arch. Hydrobiol* 67, S. 452–459.
- Gromov, B. V.; Mamkaeva, K. A. (1975): Zoospore ultrastructure of *Aphelidium chlorococcarum* Fott. (in Russian). In: *Mikol. Fitopatol.* 9, S. 190–193.
- Grossart, H.-P.; Wurzbacher, C.; James, T. Y.; Kagami, M. (2016): Discovery of dark matter fungi in aquatic ecosystems demands a reappraisal of the phylogeny and ecology of zoosporic fungi. In: *Fungal Ecology* 19, S. 28–38. DOI: 10.1016/j.funeco.2015.06.004.

- Guarnieri, M. T.; Nag, A.; Yang, S.; Pienkos, P. T. (2013): Proteomic analysis of *Chlorella vulgaris*: potential targets for enhanced lipid accumulation. In: *Journal of proteomics* 93, S. 245–253. DOI: 10.1016/j.jprot.2013.05.025.
- Guimerà, R.; Nunes Amaral, L. A. (2005): Functional cartography of complex metabolic networks. In: *Nature* 433 (7028), S. 895–900. DOI: 10.1038/nature03288.
- Guimerà, R.; Sales-Pardo, M.; Amaral, L. A. N. (2007): Classes of complex networks defined by role-to-role connectivity profiles. In: *Nature physics* 3 (1), S. 63–69. DOI: 10.1038/nphys489.
- Gurung, T. B.; Urabe, J.; Nakanishi, M. (1999): Regulation of the relationship between phytoplankton *Scenedesmus acutus* and heterotrophic bacteria by the balance of light and nutrients. In: *Aquatic Microbial Ecology* 17, S. 27–35. DOI: 10.3354/ame017027.
- Hallmann, A.; Rampelotto, P. H. (2019): Grand Challenges in Algae Biotechnology. Cham: Springer International Publishing.
- Hamilton, C. E.; Rossmeyssl, N. (2014): Exploring the utilization of complex algal communities to address algal pond crash and increase annual biomass production for algal biofuels. U.S. Department of Energy.
- He, D.; Zhan, J.; Xie, L. (2016): Problems, challenges and future of plant disease management: from an ecological point of view. In: *Journal of Integrative Agriculture* 15 (4), S. 705–715. DOI: 10.1016/S2095-3119(15)61300-4.
- Held, A. A. (1974): Attraction and attachment of zoospores of the parasitic chytrid *Rozella allomycis* in response to host-dependent factors. In: *Archiv für Mikrobiologie* 95 (2), S. 97–114. DOI: 10.1007/BF02451752.
- Helliwell, K. E.; Pandhal, J.; Cooper, M. B.; Longworth, J.; Kudahl, U. J.; Russo, D. A. *et al.* (2018): Quantitative proteomics of a B12 -dependent alga grown in coculture with bacteria reveals metabolic tradeoffs required for mutualism. In: *The New phytologist* 217 (2), S. 599–612. DOI: 10.1111/nph.14832.
- Heyer, R.; Schallert, K.; Büdel, A.; Zoun, R.; Dorl, S.; Behne, A. *et al.* (2019): A robust and universal metaproteomics workflow for research studies and routine diagnostics within 24 h using phenol extraction, FASP digest, and the MetaProteomeAnalyzer. In: *Frontiers in Microbiology* 10, S. 1883. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01883.
- Hippler, M.; Klein, J.; Fink, A.; Allinger, T.; Hoerth, P. (2001): Towards functional proteomics of membrane protein complexes: analysis of thylakoid membranes from *Chlamydomonas reinhardtii*. In: *The Plant Journal* 28 (5), S. 595–606. DOI: 10.1046/j.1365-313X.2001.01175.x.
- Hoffman, Y.; Aflalo, C.; Zarka, A.; Gutman, J.; James, T. Y.; Boussiba, S. (2008): Isolation and characterization of a novel chytrid species (phylum Blastocladiomycota), parasitic on the green alga *Haematococcus*. In: *Mycological Research* 112 (Pt 1), S. 70–81. DOI: 10.1016/j.mycres.2007.09.002.
- Höger, A.-L.; Griehl, C.; Noll, M. (2021): Infection with intracellular parasite *Amoebophilidium protococcarum* induces shifts in associated bacterial communities in microalgae cultures. In: *Journal of Applied Phycology* 33 (5), S. 2863–2873. DOI: 10.1007/s10811-021-02542-9.
- Hulatt, C. J.; Smolina, I.; Dowle, A.; Kopp, M.; Vasanth, G. K.; Hoarau, G. G. *et al.* (2020): Proteomic and transcriptomic patterns during lipid remodeling in *Nannochloropsis gaditana*. In: *International journal of molecular sciences* 21 (18). DOI: 10.3390/ijms21186946.



- Humby, P. L.; Snyder, E. C. R.; Durnford, D. G. (2013): Conditional senescence in *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). In: *J. Phycol.* 49 (2), S. 389–400. DOI: 10.1111/jpy.12049.
- Hurst, C. J. (2016): The Rasputin effect: When commensals and symbionts become parasitic. 1. Aufl.: Springer Cham (3).
- Im, S. H.; Klochkova, T. A.; Da Lee, J.; Gachon, C. M. M.; Kim, G. H. (2019): Genetic toolkits of the red alga *Pyropia tenera* against the three most common diseases in *Pyropia farms*. In: *Journal of phycology* 55 (4), S. 801–815. DOI: 10.1111/jpy.12857.
- Jackrel, S. L.; Narwani, A.; Bentlage, B.; Levine, R. B.; Hietala, D. C.; Savage, P. E. *et al.* (2018): Ecological engineering helps maximize function in algal oil production. In: *Applied and Environmental Microbiology* 84 (15). DOI: 10.1128/AEM.00953-18.
- Jackrel, S. L.; Yang, J. W.; Schmidt, K. C.; Deneff, V. J. (2021): Host specificity of microbiome assembly and its fitness effects in phytoplankton. In: *The ISME journal* 15 (3), S. 774–788. DOI: 10.1038/s41396-020-00812-x.
- Janda, J. M.; Abbott, S. L. (2007): 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. In: *J Clin Microbiol* 45 (9), S. 2761–2764. DOI: 10.1128/JCM.01228-07.
- Jephcott, T. G.; van Ogtrop, F. F.; Gleason, F. H.; Macarthur, D. J.; Scholz, B. (2017): The ecology of chytrid and aphelid parasites of phytoplankton. Chapter 16: In: John Dighton und James F. White (Hg.): *The fungal community*. CRC Press Taylor & Francis Group 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300 Boca Raton, FL 33487-2742: CRC Press (Mycology), S. 239–256.
- Jian, C.; Luukkonen, P.; Yki-Järvinen, H.; Salonen, A.; Korpela, K. (2020): Quantitative PCR provides a simple and accessible method for quantitative microbiota profiling. In: *PLoS ONE* 15 (1), e0227285. DOI: 10.1371/journal.pone.0227285.
- Kagami, M.; Elert, E. von; Ibelings, B. W.; Bruin, A. de; van Donk, E. (2007): The parasitic chytrid, *Zygorhizidium*, facilitates the growth of the cladoceran zooplankter, *Daphnia*, in cultures of the inedible alga, *Asterionella*. In: *Proceedings of the Royal Society B* 274 (1617), S. 1561–1566. DOI: 10.1098/rspb.2007.0425.
- Kagami, M.; Miki, T.; Takimoto, G. (2014): Mycoloop: chytrids in aquatic food webs. In: *Frontiers in Microbiology* 5, S. 166. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00166.
- Kaltz, O.; Shyhoff, J. A. (1998): Local adaptation in host–parasite systems. In: *Heredity* 81, S. 361–370.
- Kanehisa, M.; Furumichi, M.; Tanabe, M.; Sato, Y.; Morishima, K. (2017): KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. In: *Nucleic acids research* 45 (D1), D353–D361. DOI: 10.1093/nar/gkw1092.
- Kanehisa, M.; Goto, S. (2000): KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. In: *Nucleic acids research* 28 (1), S. 27–30. DOI: 10.1093/nar/28.1.27.
- Karki, H. S.; Barphagha, I. K.; Ham, J. H. (2012): A conserved two-component regulatory system, PidS/PidR, globally regulates pigmentation and virulence-related phenotypes of *Burkholderia glumae*. In: *Molecular plant pathology* 13 (7), S. 785–794. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2012.00787.x.

- Karpov, S. A.; Mamkaeva, M. A.; Aleoshin, V. V.; Nassonova, E.; Lilje, O.; Gleason, F. H. (2014a): Morphology, phylogeny, and ecology of the aphelids (Aphelidea, Opisthokonta) and proposal for the new superphylum Opisthosporidia. In: *Frontiers in Microbiology* 5, S. 112. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00112.
- Karpov, S. A.; Mamkaeva, M. A.; Benzerara, K.; Moreira, D.; López-García, P. (2014b): Molecular phylogeny and ultrastructure of *Aphelidium* aff. *melosirae* (Aphelida, Opisthosporidia). In: *Protist* 165 (4), S. 512–526. DOI: 10.1016/j.protis.2014.05.003.
- Karpov, S. A.; Mikhailov, K. V.; Mirzaeva, G. S.; Mirabdullaev, I. M.; Mamkaeva, K. A.; Titova, N. N.; Aleoshin, V. V. (2013): Obligately phagotrophic aphelids turned out to branch with the earliest-diverging fungi. In: *Protist* 164 (2), S. 195–205. DOI: 10.1016/j.protis.2012.08.001.
- Karpov, S. A.; Torruella, G.; Moreira, D.; Mamkaeva, M. A.; López-García, P. (2017): Molecular phylogeny of *Paraphelidium letcheri* sp. nov. (Aphelida, Opisthosporidia). In: *The Journal of eukaryotic microbiology* 64 (5), S. 573–578. DOI: 10.1111/jeu.12389.
- Karuppasamy, S.; Musale, A. S.; Soni, B.; Bhadra, B.; Gujarathi, N.; Sundaram, M. *et al.* (2018): Integrated grazer management mediated by chemicals for sustainable cultivation of algae in open ponds. In: *Algal Research* 35, S. 439–448. DOI: 10.1016/j.algal.2018.09.017.
- Kazamia, E.; Aldridge, D. C.; Smith, A. G. (2012a): Synthetic ecology – A way forward for sustainable algal biofuel production? In: *Journal of Biotechnology* 162 (1), S. 163–169. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2012.03.022.
- Kazamia, E.; Czesnick, H.; van Nguyen, T. T.; Croft, M. T.; Sherwood, E.; Sasso, S. *et al.* (2012b): Mutualistic interactions between vitamin B12 -dependent algae and heterotrophic bacteria exhibit regulation. In: *Environmental Microbiology* 14 (6), S. 1466–1476. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2012.02733.x.
- Kazamia, E.; Helliwell, K. E.; Purton, S.; Smith, A. G. (2016): How mutualisms arise in phytoplankton communities: building eco-evolutionary principles for aquatic microbes. In: *Ecology Letters* 19 (7), S. 810–822. DOI: 10.1111/ele.12615.
- Kazamia, E.; Riseley, A. S.; Howe, C. J.; Smith, A. G. (2014): An engineered community approach for industrial cultivation of microalgae. In: *Industrial Biotechnology* 10 (3), S. 184–190. DOI: 10.1089/ind.2013.0041.
- Kim, B.-R.; Shin, J.; Guevarra, R.; Lee, J. H.; Kim, D. W.; Seol, K.-H. *et al.* (2017): Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities. In: *Journal of microbiology and biotechnology* 27 (12), S. 2089–2093. DOI: 10.4014/jmb.1709.09027.
- Kimbrel, J. A.; Samo, T. J.; Ward, C.; Nilson, D.; Thelen, M. P.; Siccardi, A. *et al.* (2019): Host selection and stochastic effects influence bacterial community assembly on the microalgal phycosphere. In: *Algal Research* 40. DOI: 10.1016/j.algal.2019.101489.
- Kimura, K.; Tomaru, Y. (2014): Coculture with marine bacteria confers resistance to complete viral lysis of diatom cultures. In: *Aquatic Microbial Ecology* 73 (1), S. 69–80. DOI: 10.3354/ame01705.
- Koedooder, C.; Stock, W.; Willems, A.; Mangelinckx, S.; Troch, M. de; Vyverman, W.; Sabbe, K. (2019): Diatom-bacteria interactions modulate the composition and productivity of benthic diatom biofilms. In: *Frontiers in Microbiology* 10, S. 1255. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01255.

- Krohn-Molt, I.; Alawi, M.; Förstner, K. U.; Wiegandt, A.; Burkhardt, L.; Indenbirken, D. *et al.* (2017): Insights into microalga and bacteria interactions of selected phycosphere biofilms using metagenomic, transcriptomic, and proteomic approaches. In: *Frontiers in Microbiology* 8, S. 1941. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01941.
- Krohn-Molt, I.; Wemheuer, B.; Alawi, M.; Poehlein, A.; Güllert, S.; Schmeisser, C. *et al.* (2013): Metagenome survey of a multispecies and alga-associated biofilm revealed key elements of bacterial-algal interactions in photobioreactors. In: *Applied and Environmental Microbiology* 79 (20), S. 6196–6206. DOI: 10.1128/AEM.01641-13.
- Krug, L.; Erlacher, A.; Markut, K.; Berg, G.; Cernava, T. (2020): The microbiome of alpine snow algae shows a specific inter-kingdom connectivity and algae-bacteria interactions with supportive capacities. In: *The ISME journal* 14 (9), S. 2197–2210. DOI: 10.1038/s41396-020-0677-4.
- Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Knyaz, C.; Tamura, K. (2018): MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. In: *Molecular biology and evolution* 35 (6), S. 1547–1549. DOI: 10.1093/molbev/msy096.
- Kusmayadi, A.; Leong, Y. K.; Yen, H.-W.; Huang, C.-Y.; Chang, J.-S. (2021): Microalgae as sustainable food and feed sources for animals and humans - Biotechnological and environmental aspects. In: *Chemosphere* 271, S. 129800. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.129800.
- Lage, S.; Toffolo, A.; Gentili, F. G. (2021): Microalgal growth, nitrogen uptake and storage, and dissolved oxygen production in a polyculture based-open pond fed with municipal wastewater in northern Sweden. In: *Chemosphere* 276, S. 130122. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.130122.
- Lakaniemi, A.-M.; Hulatt, C. J.; Wakeman, K. D.; Thomas, D. N.; Puhakka, J. A. (2012): Eukaryotic and prokaryotic microbial communities during microalgal biomass production. In: *Bioresource Technology* 124 (124), S. 387–393. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.08.048.
- Langille, M. G. I.; Zaneveld, J.; Caporaso, J. G.; McDonald, D.; Knights, D.; Reyes, J. A. *et al.* (2013): Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. In: *Nature biotechnology* 31 (9), S. 814–821. DOI: 10.1038/nbt.2676.
- Larkum, A. W. D.; Ross, I. L.; Kruse, O.; Hankamer, B. (2012): Selection, breeding and engineering of microalgae for bioenergy and biofuel production. In: *Trends in Biotechnology* 30 (4), S. 198–205. DOI: 10.1016/j.tibtech.2011.11.003.
- Larsson, J. (2020): Eulerr: Area-proportional Euler and Venn diagrams with ellipses. R package version 6.1.0. Online verfügbar unter <https://cran.r-project.org/package=eulerr>.
- Lazarus, K. L.; James, T. Y. (2015): Surveying the biodiversity of the Cryptomycota using a targeted PCR approach. In: *Fungal Ecology* 14, S. 62–70. DOI: 10.1016/j.funeco.2014.11.004.
- Le Boulch, M.; Déhais, P.; Combes, S.; Pascal, G. (2019): The MACADAM database: a MetAboliC pAthways DAtabase for Microbial taxonomic groups for mining potential metabolic capacities of archaeal and bacterial taxonomic groups. In: *Database*. DOI: 10.1093/database/baz049.
- Le Chevanton, M.; Garnier, M.; Bougaran, G.; Schreiber, N.; Lukomska, E.; Bérard, J.-B. *et al.* (2013): Screening and selection of growth-promoting bacteria for *Dunaliella* cultures. In: *Algal Research* 2 (3), S. 212–222. DOI: 10.1016/j.algal.2013.05.003.

- Leary, D. J.; Petchey, O. L. (2009): Testing a biological mechanism of the insurance hypothesis in experimental aquatic communities. In: *The Journal of animal ecology* 78 (6), S. 1143–1151. DOI: 10.1111/j.1365-2656.2009.01586.x.
- Lee, P. A.; Martinez, K. J.; Letcher, P. M.; Corcoran, A. A.; Ryan, R. A. (2018): A novel predatory bacterium infecting the eukaryotic alga *Nannochloropsis*. In: *Algal Research* 32, S. 314–320. DOI: 10.1016/j.algal.2018.04.003.
- Letcher, P. M.; Lopez, S.; Schmieder, R.; Lee, P. A.; Behnke, C.; Powell, M. J.; McBride, R. C. (2013): Characterization of *Amoebophilium protococcarum*, an algal parasite new to the cryptomycota isolated from an outdoor algal pond used for the production of biofuel. In: *PLoS ONE* 8 (2), e56232. DOI: 10.1371/journal.pone.0056232.
- Letcher, P. M.; Powell, M. J. (2019): A taxonomic summary of Aphelidiaceae. In: *IMA fungus* 10, S. 4. DOI: 10.1186/s43008-019-0005-7.
- Letcher, P. M.; Powell, M. J.; Lee, P. A.; Lopez, S.; Burnett, M. (2017): Molecular phylogeny and ultrastructure of *Aphelidium desmodesmi*, a new species in Aphelida (Opisthosporidia). In: *The Journal of eukaryotic microbiology* 64 (5), S. 655–667. DOI: 10.1111/jeu.12401.
- Letcher, P. M.; Powell, M. J.; Lopez, S.; Lee, P. A.; McBride, R. C. (2015): A new isolate of *Amoebophilium protococcarum*, and *Amoebophilium occidentale*, a new species in phylum Aphelida (Opisthosporidia). In: *Mycologia* 107 (3), S. 522–531. DOI: 10.3852/14-064.
- Li, X.; Hu, H.; Zhang, Y. (2011): Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. In: *Bioresource Technology* 102 (3), S. 3098–3102. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.10.055.
- Lian, J.; Wijffels, R. H.; Smidt, H.; Sipkema, D. (2018): The effect of the algal microbiome on industrial production of microalgae. In: *Microbial Biotechnology* 11 (5), S. 806–818. DOI: 10.1111/1751-7915.13296.
- Litchman, E.; Klausmeier, C. A. (2008): Trait-based community ecology of phytoplankton. In: *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 39 (1), S. 615–639. DOI: 10.1146/annurev.ecolsys.39.110707.173549.
- Liu, W.-T.; Marsh, T. L.; Cheng, H.; Forney, L. J. (1997): Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. In: *Applied and Environmental Microbiology* 63 (11), S. 4516–4522.
- Lively, C. M.; Dybdahl, M. F. (2000): Parasite adaptation to locally common host genotypes. In: *Nature* (405), S. 679–681.
- Longworth, J.; Wu, D.; Huete-Ortega, M.; Wright, P. C.; Vaidyanathan, S. (2016): Proteome response of *Phaeodactylum tricorutum*, during lipid accumulation induced by nitrogen depletion. In: *Algal Research* 18, S. 213–224. DOI: 10.1016/j.algal.2016.06.015.
- Louca, S.; Wegener Parfrey, L.; Doebeli, M. (2016): Decoupling function and taxonomy in the global ocean microbiome. In: *Science* 353 (6305), S. 1268–1272. DOI: 10.1126/science.aad8279.
- Lozupone, C.; Knight, R. (2005): UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. In: *AEM* 71 (12), S. 8228–8235. DOI: 10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005.
- Lücking, R.; Huhndorf, S.; Pfister, D. H.; Plata, E. R.; Lumbsch, H. T. (2009): Fungi evolved right on track. In: *Mycologia* 101 (6), S. 810–822. DOI: 10.3852/09-016.

- Mahmood, T.; Jan, A.; Kakishima, M.; Komatsu, S. (2006): Proteomic analysis of bacterial-blight defense-responsive proteins in rice leaf blades. In: *Proteomics* 6 (22), S. 6053–6065. DOI: 10.1002/pmic.200600470.
- Malapascua, J. R.; Jerez, C. G.; Sergejevová, M.; Figueroa, F. L.; Masojídek, J. (2014): Photosynthesis monitoring to optimize growth of microalgal mass cultures: application of chlorophyll fluorescence techniques. In: *Aquat. Biol.* 22, S. 123–140. DOI: 10.3354/ab00597.
- Markham, A. (2020): Belantamab Mafodotin: First approval. In: *Drugs* 80 (15), S. 1607–1613. DOI: 10.1007/s40265-020-01404-x.
- Martin, M. (2011): Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. In: *EMBnet journal* 17 (1), S. 10. DOI: 10.14806/ej.17.1.200.
- Masters, M. J. (1971): The ecology of *Chytridium deltanum* and other fungus parasites on *Oocystis* spp. In: *Canadian Journal of Botany* 49 (1), S. 75–87. DOI: 10.1139/b71-016.
- Matas, I. M.; Lambertsen, L.; Rodríguez-Moreno, L.; Ramos, C. (2012): Identification of novel virulence genes and metabolic pathways required for full fitness of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive (*Olea europaea*) knots. In: *The New phytologist* 196 (4), S. 1182–1196. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2012.04357.x.
- Matthes, S. (2020): Charakterisierung eines neuartigen tubulären Photobioreaktors – Erarbeitung wesentlicher Einflussparameter und modellgestützte Effizienzbewertung phototrophen Wachstums zur stabilen Langzeitkultivierung unter Freilandbedingungen.
- Mattsson, L.; Sörenson, E.; Capo, E.; Farnelid, H. M.; Hirwa, M.; Olofsson, M. *et al.* (2021): Functional diversity facilitates stability under environmental changes in an outdoor microalgal cultivation system. In: *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 9, S. 651895. DOI: 10.3389/fbioe.2021.651895.
- Mayers, T. J.; Bramucci, A. R.; Yakimovich, K. M.; Case, R. J. (2016): A bacterial pathogen displaying temperature-enhanced virulence of the microalga *Emiliania huxleyi*. In: *Frontiers in Microbiology* 7, S. 892. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00892.
- McBride, R. C.; Lopez, S.; Meenach, C.; Burnett, M.; Lee, P. A.; Nohilly, F.; Behnke, C. (2014): Contamination management in low cost open algae ponds for biofuels production. In: *Industrial Biotechnology* 10 (3), S. 221–227. DOI: 10.1089/ind.2013.0036.
- McBride, R. C.; Smith, V. H.; Carney, L. T.; Lane, T. W. (2016): Crop protection in open ponds. In: Slocombe S.P., Benemann J.R. (HG): *Microalgal production for biomass and high-value products*. CRC Press Taylor & Francis Group Boca Raton, FL. Chapter 7.
- McCann, K. S. (2000): The diversity-stability debate. In: *Nature* 405 (6783), S. 228–233. DOI: 10.1038/35012234.
- McMurdie, P. J.; Holmes, S. (2013): Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. In: *PLoS ONE* 8 (4), e61217. DOI: 10.1371/journal.pone.0061217.
- Mehta, A.; Brasileiro, A. C. M.; Souza, D. S. L.; Romano, E.; Campos, M. A.; Grossi-de-Sá, M. F. *et al.* (2008): Plant-pathogen interactions: What is proteomics telling us? In: *The FEBS journal* 275 (15), S. 3731–3746. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2008.06528.x.

- Mendes, L. B. B.; Vermelho, A. B. (2013): Allelopathy as a potential strategy to improve microalgae cultivation. In: *Biotechnology for biofuels* 6 (1), S. 152. DOI: 10.1186/1754-6834-6-152.
- Mishra, A.; Medhi, K.; Malaviya, P.; Thakur, I. S. (2019): Omics approaches for microalgal applications: Prospects and challenges. In: *Bioresource Technology* 291, S. 121890. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.121890.
- Moheimani, N. R.; Borowitzka, M. A.; Isdepsky, A.; Sing, S. F. (2013): Standard methods for measuring growth of algae and their composition. In: Michael A. Borowitzka und Navid R. Moheimani (Hg.): *Algae for biofuels and energy*. Dordrecht: Springer Netherlands, S. 265–284.
- Molina-Grima, E.; García-Camacho, F.; Ación-Fernández, F. G.; Sánchez-Mirón, A.; Plouviez, M.; Shene, C.; Chisti, Y. (2022): Pathogens and predators impacting commercial production of microalgae and cyanobacteria. In: *Biotechnology Advances* 55, S. 107884. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2021.107884.
- Mönnich, J.; Tebben, J.; Bergemann, J.; Case, R.; Wohlrab, S.; Harder, T. (2020): Niche-based assembly of bacterial consortia on the diatom *Thalassiosira rotula* is stable and reproducible. In: *The ISME journal* 14 (6), S. 1614–1625. DOI: 10.1038/s41396-020-0631-5.
- Mooij, P. R.; Stouten, G. R.; van Loosdrecht, M. C. M.; Kleerebezem, R. (2015): Ecology-based selective environments as solution to contamination in microalgal cultivation. In: *Current Opinion in Biotechnology* 33, S. 46–51. DOI: 10.1016/j.copbio.2014.11.001.
- Muyzer, G.; Waal, E. C. de; Uiterlinden, A. G. (1993): Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. In: *Applied and Environmental Microbiology* 59 (3), S. 695–700.
- Naeem, S.; Li, S. (1997): Biodiversity enhances ecosystem reliability. In: *Nature* 390 (6659), S. 507–509. DOI: 10.1038/37348.
- Nagel, K.; Schneemann, I.; Kajahn, I.; Labes, A.; Wiese, J.; Imhoff, J. F. (2012): Beneficial effects of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing pseudomonads on the marine alga *Saccharina latissima*. In: *Aquatic Microbial Ecology* 67 (3), S. 239–249. DOI: 10.3354/ame01595.
- Nakajima, K.; Nonaka, K.; Yamamoto, K.; Yamaguchi, N.; Tani, K.; Nasu, M. (2005): Rapid monitoring of microbial contamination on herbal medicines by fluorescent staining method. In: *Lett Appl Microbiol* 40 (2), S. 128–132. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2004.01643.x.
- Nalley, J. O.; Stockenreiter, M.; Litchman, E. (2014): Community ecology of algal biofuels: Complementarity and trait-based approaches. In: *Industrial Biotechnology* 10 (3), S. 191–201. DOI: 10.1089/ind.2013.0038.
- Newby, D. T.; Mathews, T. J.; Pate, R. C.; Huesemann, M. H.; Lane, T. W.; Wahlen, B. D. et al. (2016): Assessing the potential of polyculture to accelerate algal biofuel production. In: *Algal Research* 19 (19), S. 264–277. DOI: 10.1016/j.algal.2016.09.004.
- Nylund, G. M.; Weinberger, F.; Rempt, M.; Pohnert, G. (2011): Metabolomic assessment of induced and activated chemical defence in the invasive red alga *Gracilaria vermiculophylla*. In: *PLoS ONE* 6 (12), e29359. DOI: 10.1371/journal.pone.0029359.

- Oksanen, J.; Blanchet, F. G.; Friendly, M.; Kindt, R.; Legendre, P.; Mcglinn, D. *et al.* (2019): Vegan: Community ecology package. R package version 2.4-2. Community ecology Package, 2.5-6, S. 1–296. Online verfügbar unter <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan>.
- Olaizola, M.; Grewe, C. (2019): Commercial Microalgal Cultivation Systems. In: Armin Hallmann und Pabulo H. Rampelotto (Hg.): Grand challenges in algae biotechnology. Cham: Springer International Publishing (Grand Challenges in Biology and Biotechnology), S. 3–34.
- Olesen, J. M.; Bascompte, J.; Dupont, Y. L.; Jordano, P. (2007): The modularity of pollination networks. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (50), S. 19891–19896. DOI: 10.1073/pnas.0706375104.
- Olofsson, M.; Lindehoff, E.; Legrand, C. (2019): Production stability and biomass quality in microalgal cultivation - Contribution of community dynamics. In: *Engineering in life sciences* 19 (5), S. 330–340. DOI: 10.1002/elsc.201900015.
- Paper, M. (2019): Isolation und Charakterisierung eines parasitären Stammes der Familie Aphelidea aus einer industriellen Anlage zur Algenproduktion mit *Scenedesmus vacuolatus*. Masterarbeit. Universität Bayreuth, Bayreuth, Deutschland.
- Park, Y.; Je, K.-W.; Lee, K.; Jung, S.-E.; Choi, T.-J. (2008): Growth promotion of *Chlorella ellipsoidea* by co-inoculation with *Brevundimonas* sp. isolated from the microalga. In: *Hydrobiologia* 598 (1), S. 219–228. DOI: 10.1007/s10750-007-9152-8.
- Paul, C.; Pohnert, G. (2011): Interactions of the algicidal bacterium *Kordia algicida* with diatoms: regulated protease excretion for specific algal lysis. In: *PLoS ONE* 6 (6), e21032. DOI: 10.1371/journal.pone.0021032.
- Pennekamp, F.; Pontarp, M.; Tabi, A.; Altermatt, F.; Alther, R.; Choffat, Y. *et al.* (2018): Biodiversity increases and decreases ecosystem stability. In: *Nature* 563 (7729), S. 109–112. DOI: 10.1038/s41586-018-0627-8.
- Peters, W.; Latka, I. (1986): Electron microscopic localization of chitin using colloidal gold labelled with wheat germ agglutinin. In: *Histochemistry* 84 (2), S. 155–160. DOI: 10.1007/BF00499827.
- Pinevich, A.; Gromov, B.; Mamkeava, K.; Nasonova, E. (1997): Study of molecular karyotypes in *Amoebophilidium protococcarum*, the endotrophic parasite of Chlorophycean alga *Scenedesmus*. In: *Current Microbiology* 34, S. 122–126.
- Piwosz, K.; Vrdoljak, A.; Frenken, T.; González-Olalla, J. M.; Šantić, D.; McKay, R. M. *et al.* (2020): Light and primary production shape bacterial activity and community composition of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in a microcosm experiment. In: *mSphere* 5 (4). DOI: 10.1128/mSphere.00354-20.
- Pleissner, D.; Lindner, A. V.; Ambati, R. R. (2020): Techniques to control microbial contaminants in nonsterile microalgae cultivation. In: *Applied biochemistry and biotechnology* 192 (4), S. 1376–1385. DOI: 10.1007/s12010-020-03414-7.
- Porter, K. G.; Feig, Y. S. (1980): The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. In: *Limnology and Oceanography* 25 (5), S. 943–948. DOI: 10.4319/lo.1980.25.5.0943.
- Poulson-Ellestada, K. L.; Jones, C. M.; Roy, J.; Viant, M. R.; Fernández, F. M.; Kubaneka, J.; Nunne, B. L. (2014): Metabolomics and proteomics reveal impacts of chemically mediated

- competition on marine plankton. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (34), S. 12568. DOI: 10.1073/pnas.1413432111.
- Pouneva, I. D. (2006): Effect of abscisic acid and ontogenic phases of the host alga on the infection process in the pathosystem *Scenedesmus acutus* - *Phlyctidium scenenedesmi*. In: *Acta Physiologiae Plantarum* (28(5)), S. 395–400.
- Pruesse, E.; Peplies, J.; Glöckner, F. O. (2012): SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 28 (14), S. 1823–1829. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts252.
- Ptacnik, R.; Solimini, A. G.; Andersen, T.; Tamminen, T.; Brettum, P.; Lepistö, L. *et al.* (2008): Diversity predicts stability and resource use efficiency in natural phytoplankton communities. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (13), S. 5134–5138. DOI: 10.1073/pnas.0708328105.
- Ramanan, R.; Kang, Z.; Kim, B.-H.; Cho, D.-H.; Jin, L.; Oh, H.-M.; Kim, H.-S. (2015): Phycosphere bacterial diversity in green algae reveals an apparent similarity across habitats. In: *Algal Research* 8, S. 140–144. DOI: 10.1016/j.algal.2015.02.003.
- Ramanan, R.; Kim, B.-H.; Cho, D.-H.; Oh, H.-M.; Kim, H.-S. (2016): Algae-bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications. In: *Biotechnology Advances* 34 (1), S. 14–29. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.12.003.
- Rasconi, S.; Grami, B.; Niquil, N.; Jobard, M.; Sime-Ngando, T. (2014): Parasitic chytrids sustain zooplankton growth during inedible algal bloom. In: *Frontiers in Microbiology* 5, S. 229. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00229.
- Rawat, I.; Ranjith Kumar, R.; Mutanda, T.; Bux, F. (2013): Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. In: *Applied Energy* 103, S. 444–467. DOI: 10.1016/j.apenergy.2012.10.004.
- Rodriguez-Valera, F. (2004): Environmental genomics, the big picture? In: *FEMS microbiology letters* 231 (2), S. 153–158. DOI: 10.1016/S0378-1097(04)00006-0.
- Roelke, D. L. (2017): Applying principles of resource competition theory to microalgae biomass production: A more refined relationship between species richness and productivity. In: *Algal Research* 25, S. 431–438. DOI: 10.1016/j.algal.2017.06.002.
- Rolland, J. L.; Stien, D.; Sanchez-Ferandin, S.; Lami, R. (2016): Quorum sensing and quorum quenching in the phycosphere of phytoplankton: a case of chemical interactions in ecology. In: *Journal of chemical ecology* 42 (12), S. 1201–1211. DOI: 10.1007/s10886-016-0791-y.
- Rolland, N.; Atteia, A.; Decottignies, P.; Garin, J.; Hippler, M.; Kreimer, G. *et al.* (2009): Chlamydomonas proteomics. In: *Current opinion in microbiology* 12 (3), S. 285–291. DOI: 10.1016/j.mib.2009.04.001.
- Rosales-Mendoza, S.; Solís-Andrade, K. I.; Márquez-Escobar, V. A.; González-Ortega, O.; Bañuelos-Hernandez, B. (2020): Current advances in the algae-made biopharmaceuticals field. In: *Expert opinion on biological therapy* 20 (7), S. 751–766. DOI: 10.1080/14712598.2020.1739643.
- Rosetta, C. H.; McManus, G. B. (2003): Feeding by ciliates on two harmful algal bloom species, *Prymnesium parvum* and *Prorocentrum minimum*. In: *Harmful Algae* 2 (2), S. 109–126. DOI: 10.1016/S1568-9883(03)00019-2.



- Rudkin, G. T.; Stollar, B. D. (1977): High resolution detection of DNA-RNA hybrids in situ by indirect immunofluorescence. In: *Nature* 265 (5593), S. 472–473. DOI: 10.1038/265472a0.
- Rui, J.; Li, J.; Zhang, S.; Yan, X.; Wang, Y.; Li, X. (2015): The core populations and co-occurrence patterns of prokaryotic communities in household biogas digesters. In: *Biotechnology for biofuels* 8, S. 158. DOI: 10.1186/s13068-015-0339-3.
- Saitou, N.; Nei, M. (1987): The Neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. In: *Molecular biology and evolution* 4 (4), S. 406–425. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
- Salama, E.-S.; Govindwar, S. P.; Khandare, R. V.; Roh, H.-S.; Jeon, B.-H.; Li, X. (2019): Can Omics approaches improve microalgal biofuels under abiotic stress? In: *Trends in Plant Science* 24 (7), S. 611–624. DOI: 10.1016/j.tplants.2019.04.001.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulsen, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Proceedings of the National Academics of Sciences* 74 (12), S. 5463–5467.
- Sansupa, C.; Wahdan, S. F. M.; Hossen, S.; Disayathanoowat, T.; Wubet, T.; Purahong, W. (2021): Can we use functional annotation of prokaryotic taxa (FAPROTAX) to assign the ecological functions of soil bacteria? In: *Applied Sciences* 11 (2), S. 688. DOI: 10.3390/app11020688.
- Sapp, M.; Schwaderer, A. S.; Wiltshire, K. H.; Hoppe, H.-G.; Gerdts, G.; Wichels, A. (2007): Species-specific bacterial communities in the phycosphere of microalgae? In: *Microbial Ecology* 53 (4), S. 683–699. DOI: 10.1007/s00248-006-9162-5.
- Schenk, P. M.; Thomas-Hall, S. R.; Stephens, E.; Marx, U. C.; Mussgnug, J. H.; Posten, C. *et al.* (2008): Second generation biofuels: High-efficiency microalgae for biodiesel production. In: *BioEnergy Research* 1 (1), S. 20–43. DOI: 10.1007/s12155-008-9008-8.
- Schneider, E.; Hunke, S. (1998): ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: Functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. In: *FEMS microbiology reviews* (22), S. 1–20.
- Schnepf, E.; Hegewald, E.; Soeder, C.-J. (1971): Elektronenmikroskopische Beobachtungen an Parasiten aus *Scenedesmus*-Massenkulturen. 2: Über Entwicklung und Parasit-Wirt Kontakt von Aphetidium und virusartige Partikel im Cytoplasma. In: *Archives of Mikrobiology* 75, S. 209–229.
- Schweikert, M.; Schnepf, E. (1997): Electron microscopical observations on *Pseudaphelidium drebesii* Schweikert and Schnepf, a parasite of the centric diatom *Thalassiosira punctigera*. In: *Protoplasma* 199 (3-4), S. 113–123. DOI: 10.1007/BF01294500.
- Scott, S. A.; Davey, M. P.; Dennis, J. S.; Horst, I.; Howe, C. J.; Lea-Smith, D. J.; Smith, A. G. (2010): Biodiesel from algae: challenges and prospects. In: *Current Opinion in Biotechnology* 21 (3), S. 277–286. DOI: 10.1016/j.copbio.2010.03.005.
- Seyedsayamdost, M. R.; Wang, R.; Kolter, R.; Clardy, J. (2014): Hybrid biosynthesis of roseobacticides from algal and bacterial precursor molecules. In: *Journal of the American Chemical Society* 136 (43), S. 15150–15153. DOI: 10.1021/ja508782y.
- Seymour, J. R.; Amin, S. A.; Raina, J.-B.; Stocker, R. (2017): Zooming in on the phycosphere: the ecological interface for phytoplankton-bacteria relationships. In: *Nature microbiology* 2, S. 17065. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2017.65.

- Shang, C.; Zhu, S.; Wang, Z.; Qin, L.; Alam, M. A.; Xie, J.; Yuan, Z. (2017): Proteome response of *Dunaliella parva* induced by nitrogen limitation. In: *Algal Research* 23, S. 196–202. DOI: 10.1016/j.algal.2017.01.016.
- Shapiro-Ilan, D. I.; Fuxa, J. R.; Lacey, L. A.; Onstad, D. W.; Kaya, H. K. (2005): Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. In: *Journal of invertebrate pathology* 88 (1), S. 1–7. DOI: 10.1016/j.jip.2004.10.003.
- Shurin, J. B.; Abbott, R. L.; Deal, M. S.; Kwan, G. T.; Litchman, E.; McBride, R. C. *et al.* (2013): Industrial-strength ecology: trade-offs and opportunities in algal biofuel production. In: *Ecology Letters* 16 (11), S. 1393–1404. DOI: 10.1111/ele.12176.
- Shurin, J. B.; Mandal, S.; Abbott, R. L. (2014): Trait diversity enhances yield in algal biofuel assemblages. In: *Journal of Applied Ecology* 51 (3), S. 603–611. DOI: 10.1111/1365-2664.12242.
- Sieracki, C. K.; Sieracki, M. E.; Yentsch, C. S. (1998): An imaging-in-flow system for automated analysis of marine microplankton. In: *Marine Ecology Progress Series* 168, S. 285–296. DOI: 10.3354/meps168285.
- Sime-Ngando, T. (2012): Phytoplankton chytridiomycosis: fungal parasites of phytoplankton and their imprints on the food web dynamics. In: *Frontiers in Microbiology* 3, S. 361. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00361.
- Singh, A.; Singh, I. K. (Hg.) (2018): Molecular aspects of plant-pathogen interaction. Singapore: Springer Singapore.
- Singh, B.; Guldhe, A.; Rawat, I.; Bux, F. (2014): Towards a sustainable approach for development of biodiesel from plant and microalgae. In: *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 29, S. 216–245. DOI: 10.1016/j.rser.2013.08.067.
- Smith, V. H.; Crews, T. (2014): Applying ecological principles of crop cultivation in large-scale algal biomass production. In: *Algal Research* 4, S. 23–34. DOI: 10.1016/j.algal.2013.11.005.
- Smith, V. H.; McBride, R. C.; Shurin, J. B.; Bever, J. D.; Crews, T. E.; Tilman, G. D. (2015): Crop diversification can contribute to disease risk control in sustainable biofuels production. In: *Frontiers in Ecology and the Environment* 13 (10), S. 561–567. DOI: 10.1890/150094.
- Song, H.; Lavoie, M.; Fan, X.; Tan, H.; Liu, G.; Xu, P. *et al.* (2017): Allelopathic interactions of linoleic acid and nitric oxide increase the competitive ability of *Microcystis aeruginosa*. In: *The ISME journal* 11 (8), S. 1865–1876. DOI: 10.1038/ismej.2017.45.
- Stanier, R. Y.; Deruelles, J.; Rippka, R.; Herdman, M.; Waterbury, J. B. (1979): Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. In: *Microbiology* 111 (1), S. 1–61. DOI: 10.1099/00221287-111-1-1.
- Steele, J. A.; Countway, P. D.; Xia, L.; Vigil, P. D.; Beman, J. M.; Kim, D. Y. *et al.* (2011): Marine bacterial, archaeal and protistan association networks reveal ecological linkages. In: *The ISME journal* 5 (9), S. 1414–1425. DOI: 10.1038/ismej.2011.24.
- Stern, N. (2006): Stern review: the economics of climate change. United Kingdom.
- Stewart, E. J. (2012): Growing unculturable bacteria. In: *Journal of bacteriology* 194 (16), S. 4151–4160. DOI: 10.1128/JB.00345-12.

- Stockenreiter, M.; Graber, A.-K.; Haupt, F.; Stibor, H. (2012): The effect of species diversity on lipid production by micro-algal communities. In: *Journal of Applied Phycology* 24 (1), S. 45–54. DOI: 10.1007/s10811-010-9644-1.
- Strittmatter, M.; Grenville-Briggs, L. J.; Breithut, L.; van West, P.; Gachon, C. M. M.; Küpper, F. C. (2016): Infection of the brown alga *Ectocarpus siliculosus* by the oomycete *Eurychasma dicksonii* induces oxidative stress and halogen metabolism. In: *Plant, cell & environment* 39 (2), S. 259–271. DOI: 10.1111/pce.12533.
- Su, G.; Kuchinsky, A.; Morris, J. H.; States, D. J.; Meng, F. (2010): GLay: community structure analysis of biological networks. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 26 (24), S. 3135–3137. DOI: 10.1093/bioinformatics/btq596.
- Syed, Y. Y. (2020): Sodium Oligomannate: First approval. In: *Drugs* 80 (4), S. 441–444. DOI: 10.1007/s40265-020-01268-1.
- Tanabe, Y.; Okazaki, Y.; Yoshida, M.; Matsuura, H.; Kai, A.; Shiratori, T. *et al.* (2015): A novel alphaproteobacterial ectosymbiont promotes the growth of the hydrocarbon-rich green alga *Botryococcus braunii*. In: *Scientific Reports* 5, S. 10467. DOI: 10.1038/srep10467.
- Tang, L.; Qiu, L.; Liu, C.; Du, G.; Mo, Z.; Tang, X.; Mao, Y. (2019): Transcriptomic insights into innate immunity responding to red rot disease in red alga *Pyropia yezoensis*. In: *International journal of molecular sciences* 20 (23). DOI: 10.3390/ijms20235970.
- Thangaraj, S.; Palanisamy, S. K.; Zhang, G.; Sun, J. (2020): Quantitative proteomic profiling of marine diatom *Skeletonema dohrnii* in response to temperature and silicate induced environmental stress. In: *Frontiers in Microbiology* 11, S. 554832. DOI: 10.3389/fmicb.2020.554832.
- Thangaraj, S.; Shang, X.; Sun, J.; Liu, H. (2019): Quantitative proteomic analysis reveals novel insights into intracellular silicate stress-responsive mechanisms in the diatom *Skeletonema dohrnii*. In: *International journal of molecular sciences* 20 (10). DOI: 10.3390/ijms20102540.
- Thomas, S. R.; Elkinton, J. S. (2004): Pathogenicity and virulence. In: *Journal of invertebrate pathology* 85 (3), S. 146–151. DOI: 10.1016/j.jip.2004.01.006.
- Torruella, G.; Grau-Bové, X.; Moreira, D.; Karpov, S. A.; Burns, J. A.; Sebé-Pedrós, A. *et al.* (2018): Global transcriptome analysis of the aphelid *Paraphelidium tribonemae* supports the phagotrophic origin of fungi. In: *Communications biology* 1, S. 231. DOI: 10.1038/s42003-018-0235-z.
- Toyama, T.; Kasuya, M.; Hanaoka, T.; Kobayashi, N.; Tanaka, Y.; Inoue, D. *et al.* (2018): Growth promotion of three microalgae, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris* and *Euglena gracilis*, by in situ indigenous bacteria in wastewater effluent. In: *Biotechnology for biofuels* 11, S. 176. DOI: 10.1186/s13068-018-1174-0.
- Troschl, C.; Fritz, I.; Sodnikar, K.; Drosig, B. (2017): Contaminations in mass cultivation of cyanobacteria: Highly resilient *Colpoda steinii* leads to rapid crash of *Synechocystis* sp. cultures and is inhibited by partially anoxic conditions. In: *Algal Research* 28, S. 229–234. DOI: 10.1016/j.algal.2017.11.002.
- van Donk, E. (1989): The role of fungal parasites in phytoplankton succession. In: Ulrich Sommer (Hg.): *Plankton ecology: Succession in plankton communities*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 171–194.

- van Donk, E.; Ianora, A.; Vos, M. (2011): Induced defences in marine and freshwater phytoplankton: a review. In: *Hydrobiologia* 668 (1), S. 3–19. DOI: 10.1007/s10750-010-0395-4.
- van Donk, E.; Ringelberg, J. (1983): The effect of fungal parasitism on the succession of diatoms in Lake Maarsseveen (The Netherlands). In: *Freshwater Biology* 13 (3), S. 241–251. DOI: 10.1111/j.1365-2427.1983.tb00674.x.
- Vello, V.; Chu, W.-L.; Lim, P.-E.; Majid, N. A.; Phang, S.-M. (2018): Metabolomic profiles of tropical *Chlorella* species in response to physiological changes during nitrogen deprivation. In: *Journal of Applied Phycology* 30 (6), S. 3131–3151. DOI: 10.1007/s10811-018-1504-4.
- Vogel, C.; Bodenhausen, N.; Grisse, W.; Vorholt, J. A. (2016): The *Arabidopsis* leaf transcriptome reveals distinct but also overlapping responses to colonization by phyllosphere commensals and pathogen infection with impact on plant health. In: *The New phytologist* 212 (1), S. 192–207. DOI: 10.1111/nph.14036.
- Waddell, P. J.; Steel, M. A. (1997): General time-reversible distances with unequal rates across sites: mixing gamma and inverse Gaussian distributions with invariant sites. In: *Molecular phylogenetics and evolution* 8 (3), S. 398–414. DOI: 10.1006/mpev.1997.0452.
- Wang, H.; Hill, R. T.; Zheng, T.; Hu, X.; Wang, B. (2014): Effects of bacterial communities on biofuel-producing microalgae: stimulation, inhibition and harvesting. In: *Critical reviews in biotechnology* 36 (2), S. 341–352. DOI: 10.3109/07388551.2014.961402.
- Wang, H.; Laughinghouse, H. D.; Anderson, M. A.; Chen, F.; Williams, E.; Place, A. R. et al. (2012): Novel bacterial isolate from permian groundwater, capable of aggregating potential biofuel-producing microalga *Nannochloropsis oceanica* IMET1. In: *Applied and Environmental Microbiology* 78 (5), S. 1445–1453. DOI: 10.1128/AEM.06474-11.
- Wang, H.; Zhang, W.; Chen, L.; Wang, J.; Liu, T. (2013): The contamination and control of biological pollutants in mass cultivation of microalgae. In: *Bioresource Technology* 128, S. 745–750. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.10.158.
- Wang, Y.; Castillo-Keller, M.; Eustance, E.; Sommerfeld, M. (2017a): Early detection and quantification of zooplankton grazers in algal cultures by FlowCAM. In: *Algal Research* 21, S. 98–102. DOI: 10.1016/j.algal.2016.11.012.
- Wang, Y.; Eustance, E.; Castillo-Keller, M.; Sommerfeld, M. (2017b): Evaluation of chemical treatments for control of ciliate grazers in algae cultures: A site study. In: *J Appl Phycol* 29 (6), S. 2761–2770. DOI: 10.1007/s10811-017-1150-2.
- Weller, D. M.; Landa, B. B.; Mavrodi, O. V.; Schroeder, K. L.; La Fuente, L. de; Blouin Bankhead, S. et al. (2007): Role of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in the defense of plant roots. In: *Plant biology (Stuttgart, Germany)* 9 (1), S. 4–20. DOI: 10.1055/s-2006-924473.
- Wickham, H. (2016): Ggplot2. Elegant graphics for data analysis. New York: Springer Press.
- Wilmes, P.; Bond, P. L. (2004): The application of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and downstream analyses to a mixed community of prokaryotic microorganisms. In: *Environmental Microbiology* 6 (9), S. 911–920. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2004.00687.x.

- 
- Wilmes, P.; Bond, P. L. (2006): Metaproteomics: studying functional gene expression in microbial ecosystems. In: *Trends in Microbiology* 14 (2), S. 92–97. DOI: 10.1016/j.tim.2005.12.006.
- Wiśniewski, J. R.; Zougman, A.; Nagaraj, N.; Mann, M. (2009): Universal sample preparation method for proteome analysis. In: *Nature methods* 6 (5), S. 359–362. DOI: 10.1038/nmeth.1322.
- Worden, A. Z.; Follows, M. J.; Giovannoni, S. J.; Wilken, S.; Zimmerman, A. E.; Keeling, P. J. (2015): Environmental science. Rethinking the marine carbon cycle: Factoring in the multifarious lifestyles of microbes. In: *Science* 347 (6223), S. 1257594. DOI: 10.1126/science.1257594.
- Yarkent, Ç.; Gürlek, C.; Oncel, S. S. (2020): Potential of microalgal compounds in trending natural cosmetics: A review. In: *Sustainable Chemistry and Pharmacy* 17, S. 100304. DOI: 10.1016/j.scp.2020.100304.
- Zachleder, V.; Setlík, I. (1982): Effect of irradiance on the course of RNA synthesis in the cell cycle of *Scenedesmus quadricauda*. In: *Biologia Plantarum* 24 (5), S. 341–353. DOI: 10.1007/BF02909100.
- Zhan, J.; Thrall, P. H.; Papaix, J.; Xie, L.; Burdon, J. J. (2015): Playing on a pathogen's weakness: using evolution to guide sustainable plant disease control strategies. In: *Annual review of phytopathology* 53, S. 19–43. DOI: 10.1146/annurev-phyto-080614-120040.
- Zhao, D.; Shen, F.; Zeng, J.; Huang, R.; Yu, Z.; Wu, Q. L. (2016): Network analysis reveals seasonal variation of co-occurrence correlations between Cyanobacteria and other bacterioplankton. In: *The Science of the total environment* 573, S. 817–825. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.08.150.
- Zhou, J.; Deng, Y.; Luo, F.; He, Z.; Tu, Q.; Zhi, X. (2010): Functional molecular ecological networks. In: *mBio* 1 (4). DOI: 10.1128/mbio.00169-10.

## 6.2 Abkürzungsverzeichnis

ABC	Ammoniumhydrogencarbonat
AI	mit Aphelidien infiziert
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Bb	<i>Botryococcus braunii</i>
BBM	Bolts Basal Medium
BG11	Blue Green Medium 11
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CHE	Schweiz
Chl	<i>Chlorococcum species</i>
Cs	<i>Chlorella sorokiniana</i>
DAPG	4-Diacetylphloroglucinol
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DE	Deutschland
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Dissolved organic carbon
Dq	<i>Desmodesmus quadricauda</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektrosprayionisation
FASP	Filter Aided Sample Preparation
FC	Log2 Fold Change
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
Hp	<i>Haematococcus pluvialis</i>
IAA	Iodoacetamid
ITL	Italien
ITS	Internal transcribed spacer
JAP	Japan
KASC	Köthener Algae Strain Collection
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LB	Lysogeny broth
LC	Flüssigchromatographie
LSU	Large subunit
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometer
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NDL	Niederlande

---

NGS	Next-Generation-Sequenzierung
NI	nicht infiziert
NMDS	Nichtmetrische multidimensionale Skalierung
OD	Optische Dichte
E <sub>685</sub>	Emission bei 685nm
OD <sub>750</sub>	Optische Dichte bei 750nm
OTU	Operational Taxonomic Unit
PG	Proteingruppe
PGPB	Plant growth promoting bacteria
pH	potentia hydrogenii
P <sub>i</sub>	Intermodul-Konnektivität
Pk	<i>Parachlorella kessleri</i>
PN	Probenahme
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
R2A	Reasoner's 2A agar
RNA	Ribonukleinsäuren
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SAG	Culture Collection of Algae at University Göttingen
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sm	Spongiochloris minor
So	<i>Scenedesmus obliquus</i>
SSU	Small subunit
St	<i>Stichococcus sp.</i>
Sv	<i>Scenedesmus vauolatus</i>
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TS	Trockensubstanz
Tw	<i>Tetradesmus wisconiensis</i>
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
V <sub>50</sub>	Virulenz bei 50% Rückgang Chlorophyll a Fluoreszenz
V <sub>650</sub>	Virulenz bezogen auf die Chlorophyll a Fluoreszenz
V <sub>750</sub>	Virulenz bezogen auf die optische Dichte
V <sub>TS</sub>	Virulenz bezogen auf den Trockensubstanzgehalt
WGA	Weizenkeimagglutinin
Z <sub>i</sub>	Intramodul-Konnektivität

### 6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Biologische Kontaminanten in Mikroalgenkulturen .....	18
Abbildung 2: Integration des ‚Mycoloops‘ in die die Verknüpfungen im natürlichen aquatischen Nahrungsnetz .....	20
Abbildung 3: Lebenszyklus von <i>A. protococcarum</i> in <i>Scenedesmus</i> -Kulturen .....	22
Abbildung 4: Beispielhafte Interaktionen von Mikroalgen und Bakterien .....	25
Abbildung 5: Veränderungen der Zusammensetzung der Mikroalgenegemeinschaft in einem offenen Photobioreaktor im Pilotmaßstab über sechs Monate .....	27
Abbildung 6: Methoden des Kontaminationsmanagements .....	32
Abbildung 7: Übersicht Beprobungsschema .....	62
Abbildung 8: Übersicht über die durchgeführten Arbeitsschritte zur Charakterisierung des Aphelidien-Stammes AI15TR .....	62
Abbildung 9: Experimenteller Aufbau zur Untersuchung der Wirtsspezifität von AI15TR .....	63
Abbildung 10: Experimenteller Aufbau der Kontaminationsexperimente .....	64
Abbildung 11: Experimenteller Aufbau des Proteomexperimentes .....	65
Abbildung 12: Schematische Übersicht über mögliche Spezieskombinationen zur Bildung von Mikroalgenpolykulturen in verschiedenen Diversitätsstufen .....	66
Abbildung 13: Experimenteller Aufbau der Diversitätsexperimente.....	67
Abbildung 14: Aufbau zweites Behandlungsexperimentes zur Variation der Kultivierungs- parameter.....	68
Abbildung 15: Aufbau des dritten Behandlungsexperiment zur Co-Kultivierung mit protektiven Bakterien.....	69
Abbildung 16: Morphologische Merkmale von AI15TR in <i>S. vacuolatus</i> -Kulturen .....	70
Abbildung 17: Exemplarischer Infektionsverlauf von AI15TR in <i>S. vacuolatus</i> -Kulturen.....	71
Abbildung 18: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer mit Aphelidien-Stamm AI15TR infizierten <i>S. vacuolatus</i> -Kultur .....	73
Abbildung 19: Analyse des Algen-Wirtsspektrums von <i>A. protococcarum</i> AI15TR .....	74
Abbildung 20: Verlauf von Trockensubstanzgehalt, optischer Dichte (OD <sub>750</sub> ) und Nährstoff- konzentration von <i>S. vacuolatus</i> -, <i>D. quadricauda</i> -, <i>C. sorokiniana</i> - und <i>B. braunii</i> - Kulturen.....	76
Abbildung 21: Mikroskopische Aufnahmen von nicht infizierten (1) und aphelidien-infizierten (2) Algenkulturen .....	77
Abbildung 22: Darstellung des Zuwachses der Trockensubstanz und optischen Dichte (OD <sub>750</sub> ) über 21 Tage bei <i>S. vacuolatus</i> , <i>D. quadricauda</i> , <i>C. sorokiniana</i> und <i>B. braunii</i> - Kulturen.....	78



---

Abbildung 23: Artenvielfalt (Richness) und Diversitätsindices (Shannon Index and Chao1) der Algengemeinschaft.....	80
Abbildung 24: Struktur der bakteriellen Gemeinschaft im Nonmetric dimensional Scaling (NMDS) basierend auf Bray-Curtis-Unähnlichkeit und gewichteten UniFrac-Distanz.....	81
Abbildung 25: Prozentuale Verteilung des Vorkommens bakterieller OTUs aus verschiedenen Mikroalgenpezies und Kultivierungsbedingungen .....	83
Abbildung 26: Relative Häufigkeit der bakteriellen OTUs aus verschiedenen Mikroalgenkulturen und Kultivierungsbedingungen auf Gattungsebene.....	84
Abbildung 27: Relative Häufigkeit der bakteriellen OTUs aus <i>S. vacuolatus</i> -Kulturen unter vier Kultivierungsbedingungen (steril NI, steril AI, offen NI, offen AI) auf Gattungsebene .....	85
Abbildung 28: Bakterielle Funktionsvielfalt in infizierten (AI) und nicht infizierten (NI) Algenkulturen .....	86
Abbildung 29: Berechnetes OTU-Netzwerk für bakterielle Mikrobiome aus <i>S. vacuolatus</i> ....	87
Abbildung 30: Einteilung bakterieller OTUs in verschiedenen Algenkulturen anhand ihrer topologischen Rollen im Netzwerk.....	88
Abbildung 31: Trockensubstanzgehalt, optische Dichte (OD <sub>750</sub> ), Chlorophyll a-Fluoreszenz (E <sub>685</sub> ) von <i>S. vacuolatus</i> -Kulturen. ....	89
Abbildung 32: Zusammensetzung der Proteingruppen (PG) aus <i>S. vacuolatus</i> -Kulturen nach taxonomischer Klassifizierung auf Ebene von Domäne und Reich .....	90
Abbildung 33: Relative Abundanz von eukaryotischen und bakteriellen PGs aus <i>S. vacuolatus</i> -Kulturen im zeitlichen Verlauf.....	91
Abbildung 34: Nichtmetrische dimensionale Skalierung (NMDS) auf der Grundlage euklidischer Distanzen der Abundanzen von bakteriellen und eukaryotischen Proteingruppen.....	92
Abbildung 35: Verteilung der Expressionsunterschiede bakterieller und eukaryotischer PGs zwischen aphelidien-infizierten (AI) und nicht infizierten (NI) <i>S. vacuolatus</i> -Kulturen.....	93
Abbildung 36: Funktionelle Verschiebung der bakteriellen Proteingruppen (PG) zwischen infizierten (AI) und nicht infizierten (NI) <i>S. vacuolatus</i> -Kulturen mit Fold Changes >1,5 (links) und Fold Changes >-1,5 (rechts) .....	94
Abbildung 37: Funktionelle Verschiebung der eukaryotischen Proteingruppen (PG) zwischen infizierten (AI) und nicht infizierten (NI) <i>S. vacuolatus</i> -Kulturen mit Fold Changes >1,5 (links) und >-1,5 (rechts) .....	95
Abbildung 38: Verlauf von Trockensubstanzgehalt und E <sub>685</sub> , sowie Phosphat und Nitrat-Gehalt von neun unterschiedlichen Algen-Polykulturen.....	99
Abbildung 39: Darstellung des Zuwachses von Trockensubstanzgehalt, optischen Dichte (OD <sub>750</sub> ) und Chlorophyll a Fluoreszenz (E <sub>685</sub> ) bei neun verschiedenen Polykulturen....	100

---

Abbildung 40: Prozentuale Zusammensetzung der Mikroalgen-Spezies in infizierten (AI) und nicht infizierten (NI) Polykulturen über den Verlauf von 21 Tagen .....	101
Abbildung 41: Infektionsverlauf von <i>S. vacuolatus</i> -Kulturen in verschiedenen Medien .....	102
Abbildung 42: Infektionsverlauf von <i>S. vacuolatus</i> in verschiedenen Kultivierungsbehandlungen .....	103
Abbildung 43: Darstellung des Zuwachses der Optischen Dichte ( $OD_{750}$ ) und Chlorophyll <i>a</i> Fluoreszenz ( $E_{685}$ ) bei verschiedenen Kulturbehandlungen .....	103
Abbildung 44: Infektionsverlauf von <i>S. vacuolatus</i> in verschiedenen bakteriellen Co-Kulturen .....	105
Abbildung 45: Darstellung des Zuwachses der Optischen Dichte ( $OD_{750}$ ) und Chlorophyll <i>a</i> Fluoreszenz ( $E_{685}$ ) bei verschiedenen Co-Kulturen.....	105

## 6.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Jährliche industrielle Mikroalgenproduktion.....	16
Tabelle 2: Übersicht über beschriebene Arten aus der Gruppe der Aphelidien.....	21
Tabelle 3: Lösungen zur Extraktion, Quantifizierung und Verdau von Algenproteinen .....	40
Tabelle 4: Bolds Basal Medium (BBM) .....	42
Tabelle 5: Modifiziertes BG11 Medium (BG11).....	42
Tabelle 6: Modifiziertes Setlik Medium .....	43
Tabelle 7: Lysogeny broth (LB) Medium .....	43
Tabelle 8: Reasoner's 2A agar (R2A) Medium (Sigma Aldrich) .....	43
Tabelle 9: Übersicht über verwendete Geräte .....	44
Tabelle 10: Verwendete Algenstämme mit taxonomischer Zuordnung und Stammsammlungsherkunft.....	45
Tabelle 11: Zusammensetzung und Konzentration der Mastermix-Komponenten für q-PCR Reaktionen.....	53
Tabelle 12: qPCR Programm zur Identifikation von Aphelidien.....	53
Tabelle 13: Zusammensetzung des 4%/12%-SDS-Gels zur Auftrennung der Proteinextrakten .....	58
Tabelle 14: Übersicht über verwendete Kultivierungsparameter im zweiten Behandlungsexperiment.....	67
Tabelle 15: Varianzanalyse der täglichen TS-Produktivität, OD-Zuwachses, sowie Nitrat und Phosphat Verbrauches von <i>S. vacuolatus</i> , <i>D. quadricauda</i> , <i>C. sorokiniana</i> und <i>B. braunii</i> Kulturen.....	78
Tabelle 16: Permanova-Analyse der Bray-Curtis-Dissimilaritäts- und Unifrac- Abstandsmatrizen.....	82
Tabelle 17: Charakteristika der berechneten OTU-Netzwerke .....	87
Tabelle 18: Unterschiede der euklidischen Abstände der Proteinprofile anhand einer PERMANOVA-Analyse.....	92
Tabelle 19: Liste der häufigsten (>0,1 % relative Häufigkeit) bakteriellen Proteingruppen mit Fold Changes (FC) > 1,5.....	96
Tabelle 20: Liste der häufigsten (> 0,1 % relative Häufigkeit) eukaryotischen Proteingruppen mit Fold Changes (FC) >1,5 .....	97
Tabelle 21: Einfluss verschiedene Kultivierungsregimes auf die Infektionsgeschwindigkeit	104
Tabelle 22: Einfluss zugegebenen Bakterienstämme auf die Infektionsgeschwindigkeit.....	106

## 7 Anhang

### 7.1 Ergänzende Informationen

#### 7.1.1 Illumina Sequenzierung und Amplikon-Datenverarbeitung

Zur Sequenzierung der V5- bis V7-Regionen des bakteriellen 16S rRNA-Gens wurden zweistufige Nextera PCR-Bibliotheken mit dem Primerpaar 799F (5'-AACMGGATTAGATACCCKG-3') und 1139R (5'-ACGTCATCCCCACCTTCC-3') erstellt. Anschließend wurden die PCR-Bibliotheken mit der Illumina MiSeq-Plattform und einem v2 500 Zyklen-Kit sequenziert. Die erzeugten Paired-End-Reads, die den Qualitätsfilter „chastity“ von Illumina passierten, wurden mit der Echtzeit-Analysesoftware von Illumina, die in der MiSeq-Reportersoftware v2.6 enthalten ist, dem De-Multiplexing und dem Trimmen der Illumina-Adapterreste unterzogen. Die Qualität der Reads wurde mit der Software FastQC Version 0.11.7 überprüft. Die spezifischen Primer wurden mit der Software cutadapt v1.14 aus den Sequenzier-Reads entfernt (Martin 2011). Paired-End-Reads wurden verworfen, wenn der Primer nicht getrimmt werden konnte. Die getrimmten Vorwärts- und Rückwärts-Reads jedes Paired-End-Reads wurden zur In-silico-Reform des sequenzierten Moleküls unter Berücksichtigung einer Mindestüberlappung von 15 Basen mit der Software USEARCH Version 10.0.240 zusammengeführt (Edgar 2010). Die fusionierten Sequenzen wurden anschließend qualitätsgefiltert, wobei maximal ein erwarteter Fehler pro fusioniertem Read zugelassen wurde. Reads, die mehrdeutige Basen enthielten oder Ausreißer in der Amplikongrößenverteilung waren, wurden ebenfalls aussortiert. Die verbleibenden Reads wurden mit dem in USEARCH implementierten UNOISE-Algorithmus entrauscht (Edgar 2016), um zu OTUs zusammengeführt zu werden und dabei Singletons und Chimären zu verwerfen. Die sich daraus ergebende OTU-Häufigkeitstabelle wurde dann mit dem UNCROSS-Algorithmus auf mögliche Verunreinigungen gefiltert (Edgar 2018a), und die Häufigkeiten wurden mit dem UNBIAS-Algorithmus an die 16S-Kopienzahl angepasst (Edgar 2017). Die in diesem Abschnitt beschriebenen Bibliotheken, Sequenzierungen und Datenanalysen wurden von Microsynth AG (Balgach, Schweiz) durchgeführt.

## 7.1.2 Sequenz des PCR-Produkts aus dem Primerpaar UF1/AU4 (1287 bp)

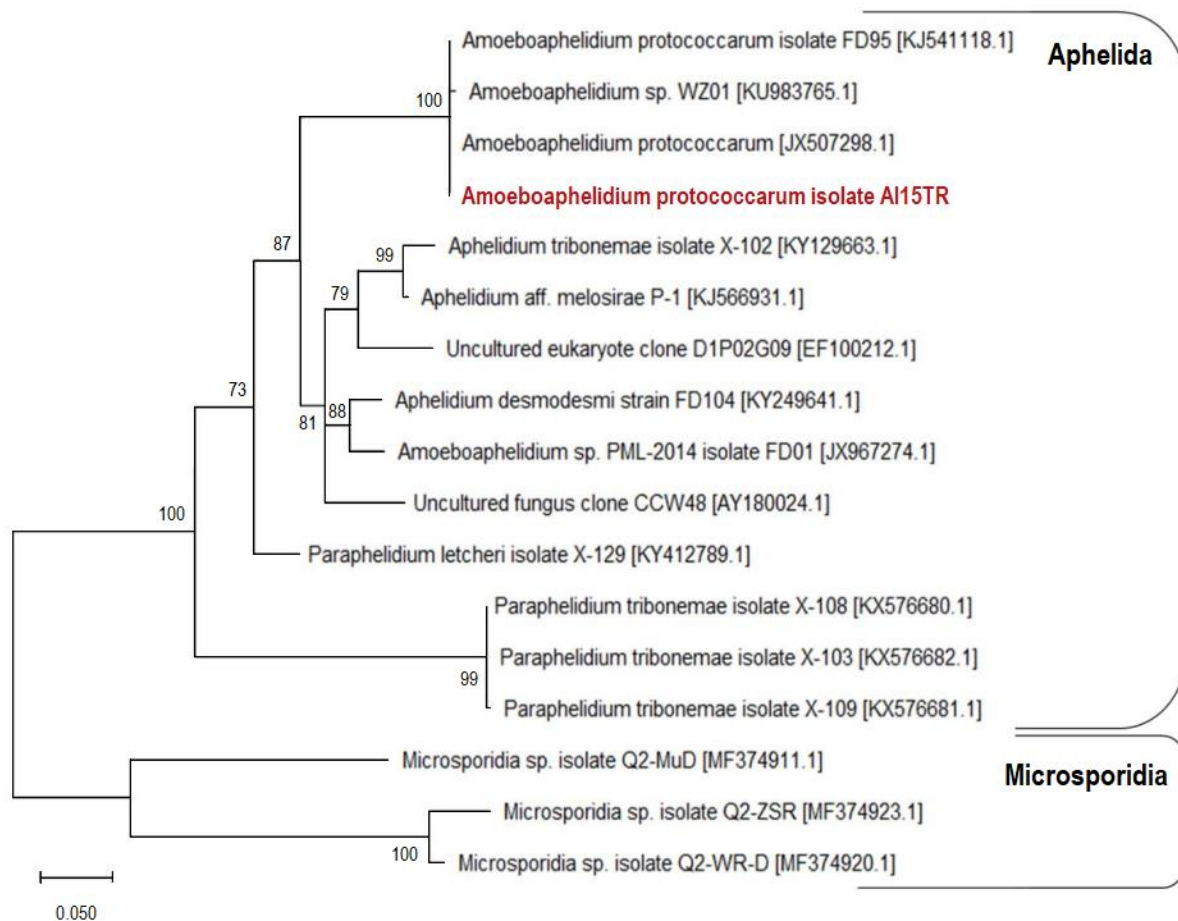
TTTATTGGACTACAATGGTTATAACGGGTAACGGGGAATAAGGGTTCGATTCCGGAGAA  
GGAGCCTGAGAAACGGCTCCTACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAA  
TGCCGACTCGGCGAGGTAGTGACAATACATAACGATACAGGGCCTTCGTGGTCCTGTA  
ATTGGAATGAGTACAATCTAAATCTCTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGCTTGGTG  
CCAGCAGCCGCGGTAATTCCAACTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCGTTAGAAACz  
GCGCGTAGTTGAATTTGGGCACAGACTGGCTGTCCGCTTAACGGCGTGCACGGCCAGG  
TTGTGTGCAACTTCCTGCCAATCTGGTCTTCTCTTACCGAGTGGGCCAGAGCGACAGG  
ACTTTTACTTTGAAAAATTAGAGTGTTTAAAGCAGGCGTTCGCTTGAATACATTAGCAT  
GGAATAATAGAATAGGACTTTGGTTCTATTTTGGTGGTTTCTAGGACCGAGGTAATGATT  
AATAGGGACAGTCGGGGGCATTAGTATTTTCAGAGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTCT  
GAAAGACTAACTACTGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTTATTAACCAAGCACGAAA  
GTCAGGGGATCAAAAATGATTAGATACCGTTGTAGTCTTGACCATAAACTATGCCGACTC  
GGGATTGGTGGAACGTAATTATACGCGTCCATCAGCACCGTACGAGATATCAAAGTGTT  
TGGGTTACGGGGGGAGTACATTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGAAATTGACGGAAGAGC  
ACAACAAGGCGTGGAATATGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAACTTACCAGGTC  
CAGACTTAATAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTTTAAAGGGGTGTGGTGCA  
TGCCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCTTAATTGCGATAACGAACGAGACCT  
TTTCTGCTAAATAGACTCACTCAGCCTTGCTGGGTGCAGCCTTCTTAGAGGGACTTTT  
GATGTTTAAATCAAAGGAAGCTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCT  
GGGCCGCACGCGCGTTACACTGATGAAGTCAACGAGTTTATTCCTTGGCTGAAAAGTCT  
GGGTAATCTTTTTAACTTCATCGTGCTGGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAA  
CGAGGAAT GCCTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCGTTGATTACGT

## 7.1.3 Sequenz des PCR-Produkts aus dem Primerpaar ITS1f/ITS4 (535 bp)

ACCTGCGGATGGATCATTACTAAATCTGTGCGTATGACTCTGCATTCTTGAATGCGT  
CTCATTCCACTTCAAATTACTCATCATTGTGAACTGTTGCTAATGTGTATGCAATCACCTT  
TTTGGTGACGCGTGCCATTAGTCTTTTATTAATACTAAACTTTTAACTAAAGATCTCTGC  
ACAACTTAGTGTTGTGTCAACTAAAACTAAACTTTTAGCAACGGATCTCTAGGCTCT  
CGCAGCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGAAATGTAATGTGAATTGCATTTACCGCGAA  
TCATTAATCTTTGAATGCACTTTGCACTGCTGTGAATTCACGGCAGTACGCCTGTTTGA  
GCATCAATCAAATTTCTCACTTTTATATAGTGATTGTGAAGTACTGGATACAGTACTTTTG  
AGTTTACACAACTGTTTCGTGTTGATACAACAGTTGGCAATATCTATATCGATCTTGTCAA  
CTCTAATCAACCGTACGCG TGTTTATTGAGCTCTGACTGCTCTCTCATTACA

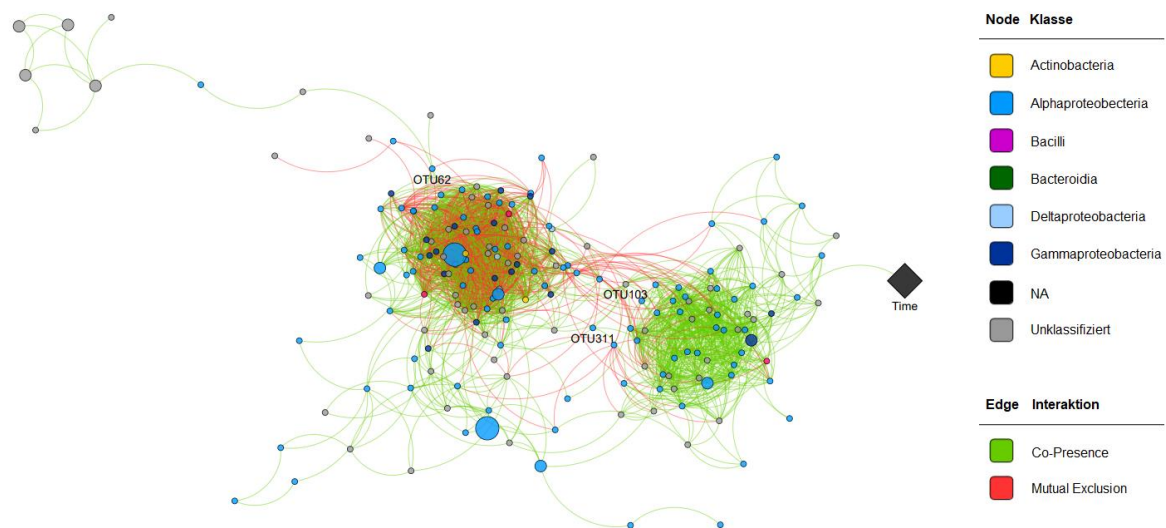
## 7.2 Ergänzende Abbildungen

Die DNA-Sequenz von AI15TR bildete ein geschlossenes Cluster zusammen zwei weiteren *A. protococcarum* Isolaten und einem weiteren, nicht näher bestimmten Stamm der Spezies *Amoeboaphelidium* (Abbildung A1). Die Einteilung des untersuchten Aphelidien-Stammes in den entsprechenden Zweig ist hier mit einem Bootstrap-Wert von 87 gegenüber dem benachbarten Zweig statistisch abgesichert. Der isolierte Aphelidien-Stamm kann somit mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit der Spezies *Amoeboaphelidium protococcarum* zugeordnet werden (Paper 2019).



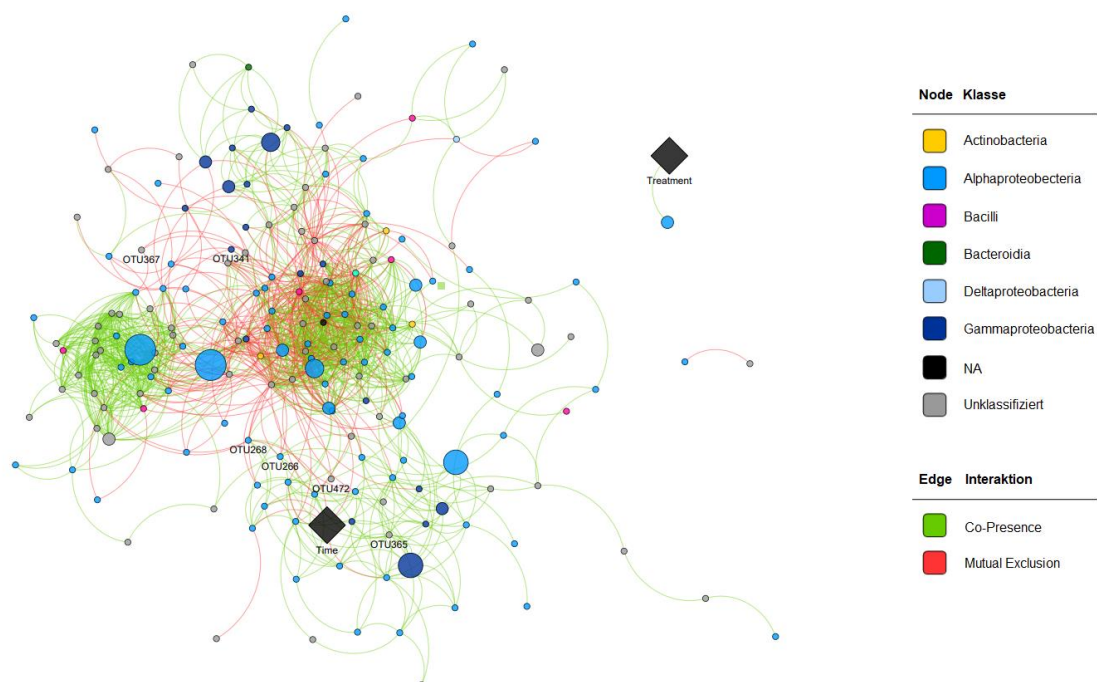
**Abbildung A1: Phylogenetische Einordnung des Aphelidien-Stammes AI15TR in die Gattung Aphelida anhand der 18S rRNA Gen Sequenz (Paper 2019)**

Berechnung basierend auf der Maximum Likelihood Methode nach dem Tamura-Nei Model auf Grundlage von 18S rRNA Gen Sequenzen (1797 bp) mit Vertretern der Microsporidia als Outgroup. Die IDs der NCBI-Datenbank sind in eckigen Klammern angegeben. Die Zahlen an den Abzweigungen geben den Bootstrap-Wert nach 1000 Wiederholungen an.



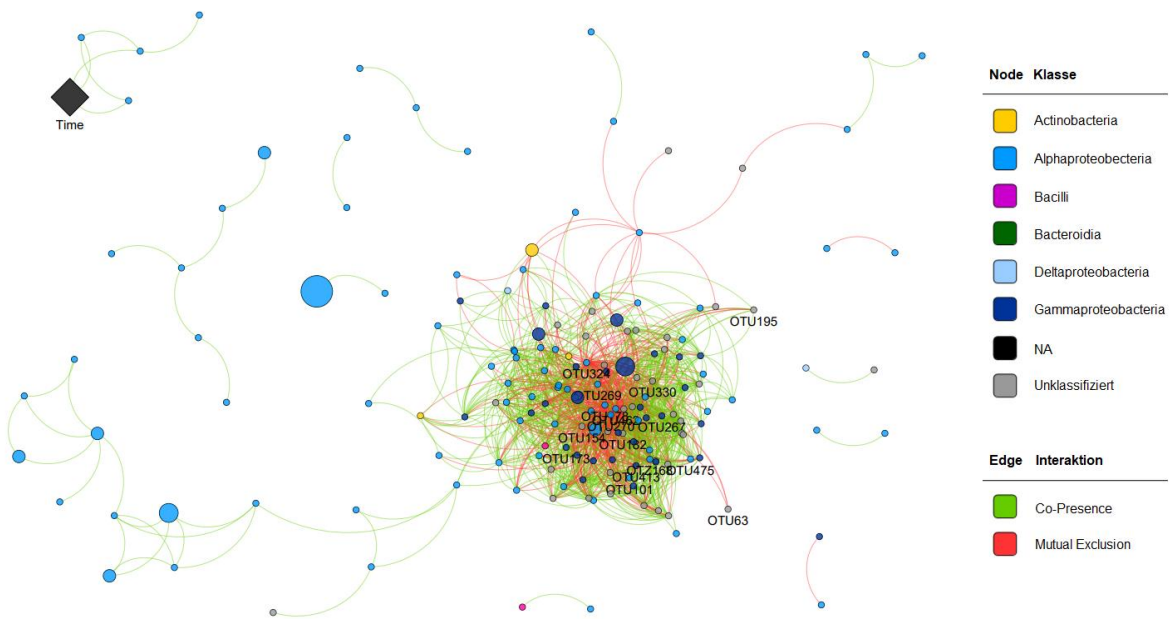
**Abbildung A2: Berechnetes OTU-Netzwerk für *Chlorella sorokiniana***

Jede Node repräsentiert eine OTU, wobei OTUs mit entscheidenden topologischen Rollen mit der entsprechenden Nummer gekennzeichnet sind. Kultivierungsparameter (Time, Treatment) sind als Raute dargestellt, bakterielle OTUs als Kreis. Die Größe der Nodes gibt die Anzahl der Interaktionen wieder. Die verschiedenen Farben zeigen die taxonomische Zuordnung an. Grüne Verbindungen stehen für positive Interaktionen (Co-Presence), rote Verbindungen für negative Interaktionen (Mutual Exclusion).



**Abbildung A3: Berechnetes OTU-Netzwerk für *Botryococcus braunii***

Jede Node repräsentiert eine OTU, wobei OTUs mit entscheidenden topologischen Rollen mit der entsprechenden Nummer gekennzeichnet sind. Kultivierungsparameter (Time, Treatment) sind als Raute dargestellt, bakterielle OTUs als Kreis. Die Größe der Nodes gibt die Anzahl der Interaktionen wieder. Die verschiedenen Farben zeigen die taxonomische Zuordnung an. Grüne Verbindungen stehen für positive Interaktionen (Co-Presence), rote Verbindungen für negative Interaktionen (Mutual Exclusion).



**Abbildung A4: Berechnetes OTU-Netzwerk für *Desmodesmus quadricauda***

Jede Node repräsentiert eine OTU, wobei OTUs mit entscheidenden topologischen Rollen mit der entsprechenden Nummer gekennzeichnet sind. Kultivierungsparameter (Time, Treatment) sind als Raute dargestellt, bakterielle OTUs als Kreis. Die Größe der Nodes gibt die Anzahl der Interaktionen wieder. Die verschiedenen Farben zeigen die taxonomische Zuordnung an. Grüne Verbindungen stehen für positive Interaktionen (Co-Presence), rote Verbindungen für negative Interaktionen (Mutual Exclusion).



## 7.3 Ergänzende Tabellen

**Tabelle A1: Taxonomische Zusammensetzung und mittlere relative Häufigkeit von Bakteriengemeinschaften, die mit verschiedenen Algenwirten assoziiert sind, auf Phylum- und Gattungsebene (n=3±SD)**

Phylum	Gattung	<i>S.vacuolatus</i>	<i>D.quadricauda</i>	<i>C.sorokiniana</i>	<i>B.braunii</i>
Alpha-Proteobakterien	<i>ANPR</i>	0.9%±0.9%	0.5%±0.5%	7.4%±3.3%	2.8%±0.8%
	<b><i>Blastomonas</i></b>	1.8%±1.8%	<b>23.2%±5.4%</b>	1.1%±0.9%	6.6%±2.2%
	<i>Bosea</i>	0.8%±0.5%	0.5%±0.2%	1.1%±0.5%	1.9%±1.1%
	<b><i>Brevundimonas</i></b>	<b>14.6%±15.5%</b>	<b>15.6%±5.0%</b>	<b>10.4%±3.3%</b>	0.1%±0.1%
	<i>Devosia</i>	10.5%±15.7%	0.8%±0.6%	0.5%±0.6%	7.7%±2.1%
	<i>Mesorhizobium</i>	0.01%±0.01%	2.2%±0.9%	1.0%±0.9%	2.2%±0.8%
	<i>Porphyrobacter</i>	1.5%±1.5%	3.3%±0.7%	<b>49.7%±5.8%</b>	<b>20.7%±8.9%</b>
	<i>Sandarakinorhabdus</i>	0.3%±0.3%	0.5%±0.1%	0.2%±0.1%	4.0%±4.2%
	<b><i>Sphingomonas</i></b>	<b>15.0%±6.8%</b>	0.8%±0.8%	0.3%±0.2%	2.0%±1.1%
	<b><i>Sphingopyxis</i></b>	0.08%±0.04%	<b>36.3%±4.4%</b>	2.2%±1.9%	<b>15.5%±7.9%</b>
Gamma-Proteobakterien	<i>Acidovorax</i>	0.1%±0.1%	0.01%±0.01%	2.2%±2.2%	0.0%±0.0%
	<i>Aquabacterium</i>	0.0%±0.0%	0.0%±0.0%	0.0%±0.0%	1.3%±0.5%
	<b><i>Hydrogenophaga</i></b>	<b>17.1%±11.6%</b>	7.7%±7.7%	1.9%±2.3%	<b>13.2%±6.6%</b>
	<i>Methylophilus</i>	6.4%±1.7%	0.3%±0.3%	0.2%±0.2%	1.4%±2.2%
	<i>Pseudomonas</i>	7.2%±11.4%	0.0%±0.0%	0.6%±0.6%	0.1%±0.1%
	<i>Stenotrophomonas</i>	5.1%±8.8%	0.0%±0.0%	0.0%±0.0%	0.1%±0.1%
	<i>Variovorax</i>	2.9%±4.9%	0.02%±0.02%	0.01%±0.02%	0.0%±0.0%
Delta-Proteobakterien	<i>Oligoflexus</i>	2.1%±1.4%	0.1%±0.1%	0.2%±0.2%	0.0%±0.0%
Bacteroidetes	<i>Sediminibacterium</i>	1.5%±0.9%	0.1%±0.1%	0.02%±0.02%	0.1%±0.1%
Unbekannte Bakterien	<b>Nicht klassifiziert</b>	7.6%±4.7%	5.6%±3.8%	<b>19.1%±1.9%</b>	<b>15.8%±2.0%</b>
Andere <1%'	Akkumulierte Gattungen	4.5%±2.8%	2.6%±0.7%	1.9%±0.7%	4.6%±1.6%

**Tabelle A2: Potentielle funktionelle Diversität der bakteriellen Gemeinschaft in Abhängigkeit der Algenwirtspezies**

Prozentuales Vorkommen der abgeleiteten Funktion basierend auf der FAPROTAX-Datenbank

<b>Abgeleitete Funktion</b>	<b><i>S.vacuolatus</i></b>	<b><i>D.quadricauda</i></b>	<b><i>C.sorokiniana</i></b>	<b><i>B.braunii</i></b>
Aerobe anoxygene Phototrophie	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
Aerobe Chemoheterotrophie	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
Tierische Parasiten oder Symbionten	100.00%	100.00%	91.67%	100.00%
Anoxygene Photoautotrophie	91.67%	100.00%	100.00%	100.00%
Anoxygene Photoautotrophie Fe-oxidierend	8.33%	100.00%	83.33%	66.67%
Anoxygene Photoautotrophie H <sub>2</sub> oxidierend	83.33%	100.00%	83.33%	83.33%
Anoxygene Photoautotrophie S-oxidierend	75.00%	100.00%	83.33%	83.33%
Abbau von aromatischen Verbindungen	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
Abbau aromatischer Kohlenwasserstoffe	100.00%	75.00%	83.33%	100.00%
Entgiftung von Arsenat	66.67%	41.67%	33.33%	33.33%
Zellulolyse	83.33%	66.67%	91.67%	91.67%
Chemoheterotrophie	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
Chitinolyse	91.67%	50.00%	100.00%	100.00%
Oxidation von dunklem Wasserstoff	100.00%	83.33%	83.33%	100.00%
Dunkle Eisenoxidation	75.00%	100.00%	91.67%	58.33%
Dunkeloxidation von Schwefelverbindungen	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
Dunkle Sulfid-Oxidation	75.00%	100.00%	83.33%	66.67%
Dunkle Schwefeloxidation	58.33%	25.00%	41.67%	16.67%
Dunkle Thiosulfat-Oxidation	91.67%	100.00%	83.33%	100.00%
Denitrifikation	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
Dissimilatorische Arsenatreduktion	66.67%	41.67%	33.33%	33.33%
Gärung	83.33%	100.00%	100.00%	100.00%
Fumarat-Atmung	50.00%	25.00%	0.00%	66.67%
Humane Krankheitserreger alle	100.00%	100.00%	91.67%	100.00%
Humane Krankheitserreger Lungenentzündung	100.00%	100.00%	91.67%	100.00%
Humane Krankheitserreger Septikämie	83.33%	58.33%	83.33%	58.33%
Kohlenwasserstoffabbau	100.00%	75.00%	83.33%	100.00%
Intrazelluläre Parasiten	83.33%	58.33%	83.33%	66.67%
Wirbellose Parasiten	0.00%	0.00%	0.00%	66.67%
Eisen-Atmung	75.00%	25.00%	0.00%	8.33%
Knallgas-Bakterien	41.67%	16.67%	58.33%	0.00%
Ligninolyse	100.00%	100.00%	83.33%	100.00%
Mangan-Oxidation	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
Mangan-Atmung	50.00%	25.00%	0.00%	0.00%

Methanol-Oxidation	<b>83.33%</b>	<b>100.00%</b>	<b>83.33%</b>	<b>75.00%</b>
Methanotrophie	8.33%	25.00%	33.33%	91.67%
Methylotrophie	91.67%	100.00%	91.67%	100.00%
Nitrat-Denitrifikation	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
Nitrat-Reduktion	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
Nitrat-Atmung	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
Nitrit-Denitrifikation	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
Nitrit-Atmung	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
Stickstoff-Fixierung	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
Stickstoff-Atmung	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
Distickstoffoxid-Denitrifikation	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
Bioremediation von Öl	91.67%	50.00%	83.33%	58.33%
Photoautotrophie	91.67%	100.00%	100.00%	100.00%
Photoheterotrophie	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
Fototrophie	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
Pflanzenpathogene	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
Abbau von Plastik	100.00%	100.00%	83.33%	100.00%
Räuberisch oder exoparasitisch	0.00%	0.00%	8.33%	0.00%
Ureolyse	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
Xylanolyse	100.00%	16.67%	100.00%	100.00%

**Tabelle A3: Potentielle funktionelle Diversität der bakteriellen Gemeinschaft in Abhängigkeit der Kultivierungsbedingungen**

Prozentuales Vorkommen der abgeleiteten Funktion basierend auf der FAPROTAX-Datenbank

<b>Abgeleitete Funktion</b>	<b>NI</b>	<b>AI</b>	<b>steril</b>	<b>offen</b>
Aerobe anoxygene Phototrophie	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
Aerobe Chemoheterotrophie	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
Tierische Parasiten oder Symbionten	95.83%	100.00%	95.83%	100.00%
Anoxygene Photoautotrophie	95.83%	100.00%	95.83%	100.00%
Anoxygene Photoautotrophie Fe-oxidierend	66.67%	62.50%	66.67%	62.50%
Anoxygene Photoautotrophie H <sub>2</sub> oxidierend	79.17%	95.83%	87.50%	87.50%
Anoxygene Photoautotrophie S-oxidierend	75.00%	95.83%	87.50%	83.33%
Abbau von aromatischen Verbindungen	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
Abbau aromatischer Kohlenwasserstoffe	79.17%	100.00%	87.50%	95.83%
Entgiftung von Arsenat	12.50%	75.00%	41.67%	41.67%
Zellulolyse	66.67%	100.00%	87.50%	87.50%
Chemoheterotrophie	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
Chitinolyse	79.17%	91.67%	83.33%	87.50%
Oxidation von dunklem Wasserstoff	83.33%	100.00%	87.50%	95.83%

Dunkle Eisenoxidation	79.17%	83.33%	87.50%	75.00%
Dunkeloxidation von Schwefelverbindungen	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
Dunkle Sulfid-Oxidation	75.00%	87.50%	83.33%	79.17%
Dunkle Schwefeloxidation	4.17%	66.67%	33.33%	33.33%
Dunkle Thiosulfat-Oxidation	87.50%	100.00%	91.67%	95.83%
Denitrifikation	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
Dissimilatorische Arsenatreduktion	12.50%	75.00%	41.67%	41.67%
Gärung	91.67%	100.00%	91.67%	100.00%
Fumarat-Atmung	29.17%	41.67%	25.00%	41.67%
Humane Krankheitserreger alle	95.83%	100.00%	95.83%	100.00%
Humane Krankheitserreger Lungenentzündung	95.83%	100.00%	95.83%	100.00%
Humane Krankheitserreger Septikämie	50.00%	91.67%	66.67%	79.17%
Kohlenwasserstoffabbau	79.17%	100.00%	87.50%	95.83%
Intrazelluläre Parasiten	54.17%	91.67%	70.83%	79.17%
Wirbellose Parasiten	20.83%	12.50%	12.50%	20.83%
Eisen-Atmung	16.67%	37.50%	25.00%	25.00%
Knallgas-Bakterien	16.67%	41.67%	20.83%	37.50%
Ligninolyse	91.67%	100.00%	91.67%	100.00%
Mangan-Oxidation	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
Mangan-Atmung	8.33%	29.17%	12.50%	20.83%
Methanol-Oxidation	75.00%	95.83%	79.17%	91.67%
Methanotrophie	33.33%	45.83%	45.83%	37.50%
Methylotrophie	91.67%	100.00%	95.83%	95.83%
Nitrat-Denitrifikation	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
Nitrat-Reduktion	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
Nitrat-Atmung	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
Nitrit-Denitrifikation	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
Nitrit-Atmung	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
Stickstoff-Fixierung	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
Stickstoff-Atmung	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
Distickstoffoxid-Denitrifikation	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
Bioremediation von Öl	45.83%	95.83%	62.50%	79.17%
Photoautotrophie	95.83%	100.00%	95.83%	100.00%
Photoheterotrophie	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
Fototrophie	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
Pflanzenpathogene	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
Abbau von Plastik	91.67%	100.00%	91.67%	100.00%
Räuberisch oder exoparasitisch	4.17%	0.00%	0.00%	4.17%
Ureolyse	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
Xylanolyse	79.17%	79.17%	83.33%	83.33%

**Tabelle A4: Liste der bakteriellen Proteingruppen (PGs) mit Log<sub>2</sub>-Fold Changes > ±1,5 mit Übereinstimmung zur Pflanzen-Pathogen-Datenbank PHI**

PG	Description	PFAM	Mutant Phenotyp	Pathogen	Host	ProteinID	PHI_ID
395	ABC transporter complex	PF00005	reduced virulence	<i>Pseudomonas cannabina</i>	<i>Avena strigosa</i>	F3HSJ9	9661
781	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	PF01474	loss of pathogenicity	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Q8XW15	8884
1656	Carbamoyl-phosphate synthetase ammonia chain	PF02786	reduced virulence	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Q87WP3	6594
1809	ATP-dependent zinc metallopeptidase	PF00004	reduced virulence	<i>Erwinia amylovora</i>	<i>Malus domestica</i>		11094
1815	thiolase family	PF02803	reduced virulence	<i>Leptosphaeria maculans</i>	<i>Brassica napus</i>	Q0QWD8	598
1931	Catalyzes the final step of fatty acid oxidation	PF02803	reduced virulence	<i>Leptosphaeria maculans</i>	<i>Brassica napus</i>	Q0QWD8	598
1931	thiolase family	PF02803	reduced virulence	<i>Leptosphaeria maculans</i>	<i>Brassica napus</i>	Q0QWD8	598
2385	amidase family	PF01510	reduced virulence	<i>Pseudomonas cannabina</i>	<i>Avena strigosa</i>	F3HQR8	9663
2407	HsdM N-terminal domain	PF12161	reduced virulence	<i>Xanthomonas axonopodis</i>	<i>Glycine max</i>	A0A1D9-ELP8	8921
2781	Glycosyl transferases group1	PF00534	unaffected pathogenicity	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q888F9	9688
2781	Glycosyl transferases group1	PF00534	unaffected pathogenicity	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q888F9	9688
2802	Transcriptional regulator, LuxR family	PF00196	loss of pathogenicity	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Q93NJ9	6105
2837	Putative diguanylate phosphodiesterase	PF00563	increased virulence	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	<i>Galleria mellonella</i>	B4E974	8841
2877	Histidine kinase	PF08521	reduced virulence	<i>Xanthomonas campestris</i>	<i>Brassica oleracea</i>	B0RY65	3107
2915	Peptidoglycan polymerase	PF00912	reduced virulence	<i>Pseudomonas savastanoi</i>	<i>Olea europaea</i>	D7HWI3	2776
3524	Catalyzes the synthesis of acetoacetyl coenzyme A	PF02803	reduced virulence	<i>Leptosphaeria maculans</i>	<i>Brassica napus</i>	Q0QWD8	598
3561	ABC transporter	PF00005	reduced virulence	<i>Pseudomonas cannabina</i>	<i>Avena strigosa</i>	F3HSJ9	9661
3625	Type VI secretion protein, vc_a0107 family	PF05591	reduced virulence	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>Solanum melongena</i>		11069
3654	Histidine kinase	PF08521	reduced virulence	<i>Xanthomonas campestris</i>	<i>Brassica oleracea</i>	B0RY65	3107
3691	Transglycosylase	PF00912	reduced virulence	<i>Pseudomonas savastanoi</i>	<i>Olea europaea</i>	D7HWI3	2776
3703	NAD(P)-dependent epimerase dehydratase family	PF01370	reduced virulence	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	<i>Daucus carota</i>		9304
3722	resistance-nodulation-cell division (TC 2.A.6) family	PF00873	reduced virulence	<i>Pseudomonas cannabina</i>	<i>Brassica oleracea</i>	F3HJT6	9660
3731	Beta-lactamase superfamily domain	PF12706	reduced virulence	<i>Xanthomonas campestris</i>	<i>Raphanus sativus</i>	Q4UWM4	3965
3749	OmpA	PF01389	reduced virulence	<i>Xanthomonas axonopodis</i>	<i>Glycine max</i>		9221

**Tabelle A5: Liste der erkaryotischen Proteingruppen (PGs) mit Log<sub>2</sub>-Fold Changes > ±1,5 mit Übereinstimmung zur Pflanzen-Pathogen-Datenbank PHI**

PG	Description	PFAM	Mutant Phenotype	Pathogen	Host	ProteinID	PHI_ID
733	Leucine Rich repeat	PF13516	effector	<i>Phytophthora capsici</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>		7029
789	The proteasome is a multicatalytic proteinase complex	PF00227	effector	<i>Hyaloperonospora arabidopsidis</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	G3C9P1	4751
1419	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase family	PF02800	reduced virulence				
1450	Aldehyde dehydrogenase family	PF00171	reduced virulence				
3327	protein kinase superfamily (Autophagy)	PF00069	reduced virulence	<i>Ustilago maydis</i>	<i>Zea mays</i>	O59918	158
3150	Metallo-beta-lactamase	PF00753	reduced virulence	<i>Xanthomonas campestris</i>	<i>Raphanus sativus</i>	Q4UWM4	3965
489	lactate/malate dehydrogenase,	PF02866	reduced virulence	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Triticum aestivum</i>	I1R9K2	8645
727	Sulfite reductase	PF01077	unaffected pathogenicity	<i>Erwinia amylovora</i>	<i>Malus domestica</i>	D4HWM2	9323
792	PUB domain	PF09409	reduced virulence	<i>Magnaporthe oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	G4NGN1	11061
796	ubiquitin-ubiquitin ligase activity	PF00622	reduced virulence	<i>Magnaporthe oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	G4MVC5	6927
877	Belongs to the ubiquitin-activating E1 family	PF16191	reduced virulence	<i>Magnaporthe oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	G4MVC5	6927
968	ABC transporter	PF00005	reduced virulence	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Triticum aestivum</i>	I1S2J9	3924
971	protein disulfide oxidoreductase activity	PF01507	reduced virulence	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>		3079
1079	TRAFAC class dynamin-like GTPase superfamily. Dynamin Fzo YdjA family	PF01031	reduced virulence	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Triticum aestivum</i>	I1RBC0	10481
1136	Serine threonine-protein phosphatase	PF00149	reduced virulence	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	A0A0D-2XC66	10879
1136	Serine threonine-protein phosphatase	PF00149	reduced virulence	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	A0A0D-2XC66	10879
1348	SCP-2 sterol transfer family	PF02036	reduced virulence	<i>Ustilago maydis</i>	<i>Zea mays</i>	A0A0D-1E3D1	8183
1408	Ubiquitinyl hydrolase 1	PF00627	reduced virulence	<i>Magnaporthe oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	G4NGN1	11061
1441	Thioredoxin-like domain	PF00085	reduced virulence	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>		3081
3275	sirtuin family. Class I subfamily	PF02146	reduced virulence	<i>Magnaporthe oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	G4NHH2	11101



## Danksagung

Zunächst möchte ich mich im besonderen Maße bei meinem Doktorvater Herrn **Prof. Dr. Matthias Noll** für die Möglichkeit, meine Dissertation unter seiner Anleitung anfertigen zu können und für die kompetente wissenschaftliche Betreuung bedanken. Vielen Dank für die stetige Diskussionsbereitschaft und konstruktiven Kommentare zu meiner Arbeit.

Mein herzlicher Dank gilt außerdem Frau **Prof. Dr. Carola Griehl** für die Gelegenheit, meine Promotion in ihrer Arbeitsgruppe an der Hochschule Anhalt durchzuführen, für zahlreiche gute Ratschläge und die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit.

Herrn **Prof. Dr. Andreas Römpf** danke ich für die Übernahme des Mentorats, ebenso Herrn **Prof. Dr. Gerhard Rambold**, der sich bereit erklärt hat, ein Gutachten dieser Arbeit anzufertigen und **Prof. Dr. Tillmann Lüders** für die Übernahme des Vorsitzes des Kolloquiums.

Bei allen Mitarbeitern am Kompetenzzentrum Algenbiotechnologie der Hochschule Anhalt möchte ich mich für eine konstruktive Arbeitsatmosphäre sowie die stetige Hilfsbereitschaft und Unterstützung im Labor in den letzten Jahren bedanken. Vielen Dank Anita Czech, Dr. Claudia Tilliger, Frank Langguth, Franziska Büschelberger, Dr. Kathrin Brückner, Marco Hoffmann, Mercedes Scharfe, Mario Salisch, Simone Bieler, und Steffen Töpferwien. Auch allen Studenten, deren Abschlussarbeit ich betreuen durfte, möchte ich herzlich danken. Danke **Michael Paper** für den Beitrag zu meiner Arbeit durch deine gelungene Masterthesis. Mein besonderer Dank gilt außerdem den aktuellen/ehemaligen Doktoranden der Algenbiotechnologie - **Alexander Kettner** und **Dr. Christian Kleinert**, mit denen zahllose Stunden im Labor wie in Flug vergangen sind und die mich immer motiviert haben, mein Bestes zu geben. Danke für die zahlreichen fachlichen Diskussionen und die entstandene Freundschaft.

Weiterer Dank gilt den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Bioanalytik an der Hochschule Coburg, insbesondere **Dr. Christian Büttner** und **Angeline Hoffmann**, die mich in den letzten Jahren immer wieder für kurze Forschungsaufenthalte herzlich aufgenommen haben und mir bei Fragen mit ihrem Fachwissen zur Seite standen.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn **Prof. Dr. Dirk Benndorf** für die technische Unterstützung bei der Aufarbeitung der Metaproteomproben und bei Herrn **Dr. Nico Jehmlich** vom Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung Leipzig für die Durchführung der Proteommessungen und die Hilfe bei der Auswertung bedanken.



---

Dem Fachbereich Biosolar der GICON®-Großmann Ingenieur Consult GmbH möchte ich für die gute Zusammenarbeit im Forschungsprojekt KiM (FKZ ZS/2020/04/124241) danken. Vielen Dank **Dr. Martin Ecke** für das Teilen deiner langjährigen Erfahrung und **Lea Liebscher** für die Unterstützung bei der Durchführung im Projekt.

Mein ganz besonderer Dank gilt nicht zuletzt meiner **Familie**, insbesondere meinen **Eltern**, die mich auf all meinen Lebenswegen immer bedingungslos unterstützt haben. Ihr habt mich zu dem Menschen werden lassen, der nun seine Promotion ablegen darf.

Danke **Oliver**, für die jahrelange Unterstützung und das Durchstehen aller Unwägbarkeiten und Kompromisse. Deine tagtägliche fachliche und mentale Unterstützung hat diese Arbeit erst ermöglicht. Mein ewiger Dank.



---

## **(Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen**

(§ 9 Satz 2 Nr. 3 PromO BayNAT)

*Hiermit versichere ich eidesstattlich, dass ich die Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe (vgl. Art. 64 Abs. 1 Satz 6 BayHSchG).*

(§ 9 Satz 2 Nr. 3 PromO BayNAT)

*Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht habe und dass ich nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden habe.*

(§ 9 Satz 2 Nr. 4 PromO BayNAT)

*Hiermit erkläre ich, dass ich Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. -vermittlern oder ähnlichen Dienstleistern weder bisher in Anspruch genommen habe noch künftig in Anspruch nehmen werde.*

(§ 9 Satz 2 Nr. 7 PromO BayNAT)

*Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass die elektronische Fassung meiner Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung unterzogen werden kann.*

(§ 9 Satz 2 Nr. 8 PromO BayNAT)

*Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass bei Verdacht wissenschaftlichen Fehlverhaltens Ermittlungen durch universitätsinterne Organe der wissenschaftlichen Selbstkontrolle stattfinden können.*

.....

Ort, Datum, Unterschrift