

## **Abschlussbericht zum ZIM - Kooperationsprojekt:**

### **Stimulierung von internen Anregungsprozessen in Algen durch eine zusätzliche kontinuierliche oder gepulste UV-Strahlung**

Teilprojekt:

### **Untersuchung der internen Prozesse in Algenzellen bei zusätzlicher UV-Strahlung**

Förderkennzeichen: **KF2223307AK2**

Projektlaufzeit: **01.05.2012 - 30.06.2014**

Berichtszeitraum: **01.05.2012 - 30.06.2014**

Projektträger: **AiF Projekt GmbH**

Tschaikowskistraße 49

13156 Berlin

Kooperationspartner: **Neon Böhm GmbH & Co.KG**

Friedrich-Ebert-Straße 20, 98693 Ilmenau

**Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden**

Fakultät Landbau / Landespflege

Pillnitzer Platz 2, 01326 Dresden

Bearbeiter: M.Sc. Claudia Scharff

Dipl.-Ing. (FH) Daniel Brohm

Dipl.-Ing. (FH) Nico Domurath

Projektleiter: Prof. Dr. agr. Prof. h.c. Fritz-Gerald Schröder

## **Aufgabenstellung**

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass die Nutzung von Mikroalgen in unterschiedlichsten Anwendungsbereichen (u.a. Biotrockenmassennutzung, Energieerzeugung, Extraktion wertgebender Inhaltsstoffe, Futtermittel, Nahrungsergänzungsmittel) ein großes Potential besitzt, aber die Kosten zur Produktion und Aufbereitung bzw. der Aufwand zur Gewinnung der Inhaltsstoffe der geringen Produktivität und Ausbeute negativ gegenübersteht. Im Fokus dieses Projektes lag deshalb die Entwicklung von Verfahren und Methoden, um das erhebliche Potential der Mikroalgen weiter (ökonomisch) ausschöpfen zu können.

Grundannahme war, dass es durch eine gezielte UV-Bestrahlung zur Anregung einzelner Zellorganellen bzw. des gesamten Algenorganismus kommen kann. Die so erzeugten Stresszustände sollten durch das Aufzeigen definierter Behandlungswege dazu führen, dass die jeweiligen Kulturziele (z.B. maximale Biomassebildung, verstärkte Bildung wertgebender Inhaltsstoffe, erleichterter Zugang zu Inhaltsstoffen durch verbesserte Aufschlusseigenschaften) zuverlässig erreicht werden können. Dazu sollten enger Zusammenarbeit mit dem beteiligten Projektpartner Neon Böhm GmbH & Co. KG spezielle UV-Strahler entwickelt Laboranlagen konzipiert und in versuchstaugliche Labormuster umgesetzt werden, mit deren Hilfe verschiedene Behandlungen von Algenmedien mit unterschiedlichen Wellenlängen, Leistungen und Behandlungsintervallen ermöglicht werden sollten. Eine Behandlung im nicht-thermischen Bereich dabei war anzustreben.

Ziel des Teilforschungsprojektes war es, den Einfluss von zusätzlicher UV-Strahlung im Hinblick auf folgende Parameter zu untersuchen:

- Erhöhung der Quantität und Qualität relevanter Inhaltsstoffe wie z.B. von Fettsäuren, Carotinoiden, Proteinen
- Steigerung der Biotrockenmasseproduktivität

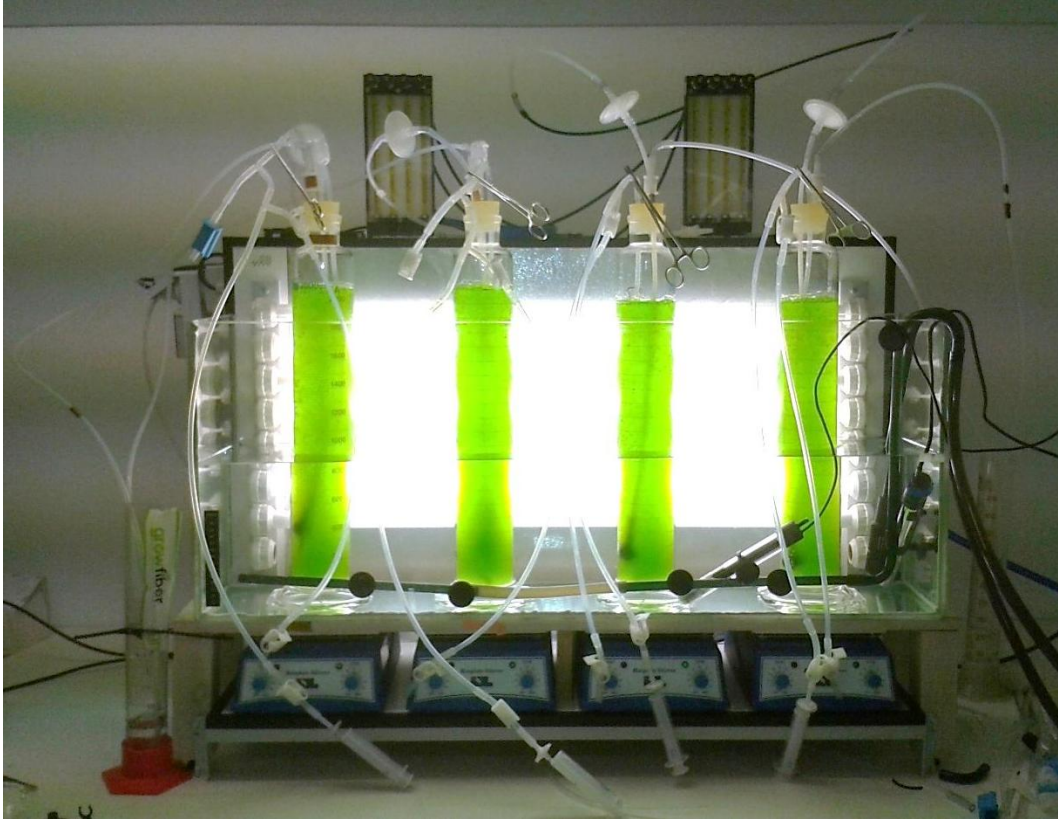
Wesentliche wissenschaftlich-technische Ergebnisse

### **Arbeitspaket 1: Konzipierung des gesamten Versuchsaufbaus; Simulation der Bestrahlungsabläufe; Auswahl und Vorbereitung der Algensysteme**

Im Rahmen dieses Arbeitspaketes wurde versucht, den gesamten Versuchsablauf für die Projektlaufzeit zu strukturieren, Rahmenbedingungen zu definieren und zeitliche Abläufe so festzulegen, um die Zielstellung des FuE-Vorhabens umfassend bearbeiten zu können. Grundlage dafür bildete die Auseinandersetzung mit möglichen Mechanismen der Wechselwirkung unterschiedlicher Einflussfaktoren auf das Algenwachstum und die Bildung wertgebender Inhaltsstoffe.

Zunächst wurde neben einer entsprechenden Erhaltungszucht ein Kultivierungssystem basierend auf dem Prinzip eines Blasensäulenreaktors konzipiert und aufgebaut (Abb. 1). Die Anlage ermöglicht die definierte Kultivierung von vier Kolben mit jeweils bis zu zwei Litern Algensuspension. Die Einhaltung höchster hygienischer Standards vor und während der Kultivierung ist unbedingt erforderlich, da im System optimale Bedingungen auch für andere Organismen vorherrschen. Während der Projektlaufzeit konnten zahlreiche Verbesserungen am Algenreaktor vorgenommen werden, die u.a. zu

einer sterilen Medienzufuhr und eines entsprechend sterilen Probenahmeausgangs an den Kolben führten.



**Abb. 1: Blasensäulenreaktor zur Kultivierung der Algen**

Die Kolben befinden sich in einem temperaturkompensierten Wasserbad. Durch die Begasung mit steriler Druckluft ist sowohl eine homogene Durchmischung, als auch Kohlenstoffquelle ( $\text{CO}_2$ -Anteil 400 ppm) gewährleistet, wodurch die Algen photoautotroph kultiviert werden können. Für die untersuchten Mikroalgenarten wurde ein entsprechendes Nährmedium nach Tamiya et al. (1953) angepasst (Tab. 1). Grundlage für die vorgenommenen Anpassungen bildeten die Ergebnisse der Masterarbeit Frau Ziegler (2012), die im Rahmen des Projektes betreut wurde.

**Tabelle 1: Ausgangsnährmedium modifiziert nach Tamiya et al. (1953)**

	einfach	<i>C. vulgaris</i>	<i>S. obliquus</i>
KNO <sub>3</sub>	0,50 g	0,50 g	0,70 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,50 g	0,50 g	0,50 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,34 g	0,34 g	0,34 g
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O (Stammlsg. 7 g/l mit 2 g/l EDTA)	2,00 ml	2,00 ml	2,00 ml
Spurenelementlsg. I	0,01 ml	0,01 ml	0,01 ml
Spurenelementlsg. II	0,01 ml	0,1 ml	
Aqua dest. ad	1,00 l	1,0 l	

**Spurenelementlösung 1**

ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	74,0 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5,7 g
CoSO <sub>4</sub>	23,8 g
CuSO <sub>4</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	23,6 g
MnSO <sub>4</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	410,0 g
Aqua dest. ad	1,0 l

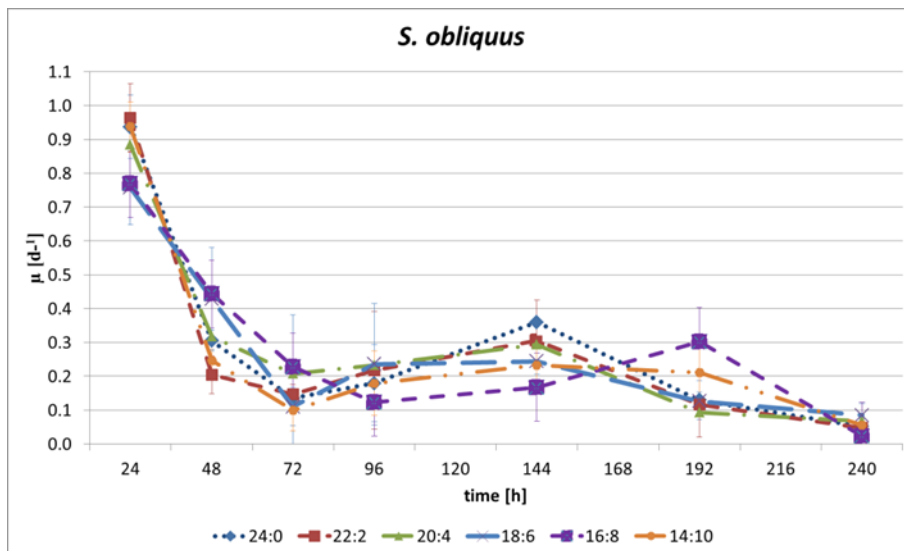
**Spurenelementlösung 2**

(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	9,2 g
Aqua dest. ad	1,0 l

Um reproduzierbare, wissenschaftlich verwertbare Ergebnisse generieren zu können, wurde für die in den Versuchen eingesetzten Mikroalgenarten *Chlorella vulgaris* und *Scenedesmus obliquus* ein entsprechendes Versuchs- und Beprobungsschema erarbeitet. In Vorversuchen hat sich gezeigt, dass eine Versuchsdauer von 11 Tagen zur Charakterisierung des Wachstums bzw. des UV-Einflusses unter den gegebenen Bedingungen (Batchverfahren mit oben beschriebenem Nährmedium) geeignet ist. Während dieser Kultivierungszeit wurden während der ersten fünf Tage eine tägliche, im Anschluss daran aller zwei Tage Probennahmen zur Dokumentation und Überwachung des Wachstums vorgenommen. Dabei wurden folgende Parameter bestimmt:

- optische Dichte (OD) bei 750 nm (Milton Roy Spectronic 401)
- pH-Wert
- Zellzahl (Zellzählung mit Thomazählkammer)
- Zellgröße (Digitalmikroskop Keyence VHX 100; bei *Scenedesmus obliquus* nicht geeignet, auf Grund unregelmäßiger Formen während eines Zellzyklus)
- Chlorophyllgehalt durch methanolische Extraktion (nach Lichtenthaler und Buschmann 2001).

Alle laufend ermittelten Parameter wurden entsprechend aufbereitet, ausgewertet sowie Wachstumskurven erstellt (Abb. 2).



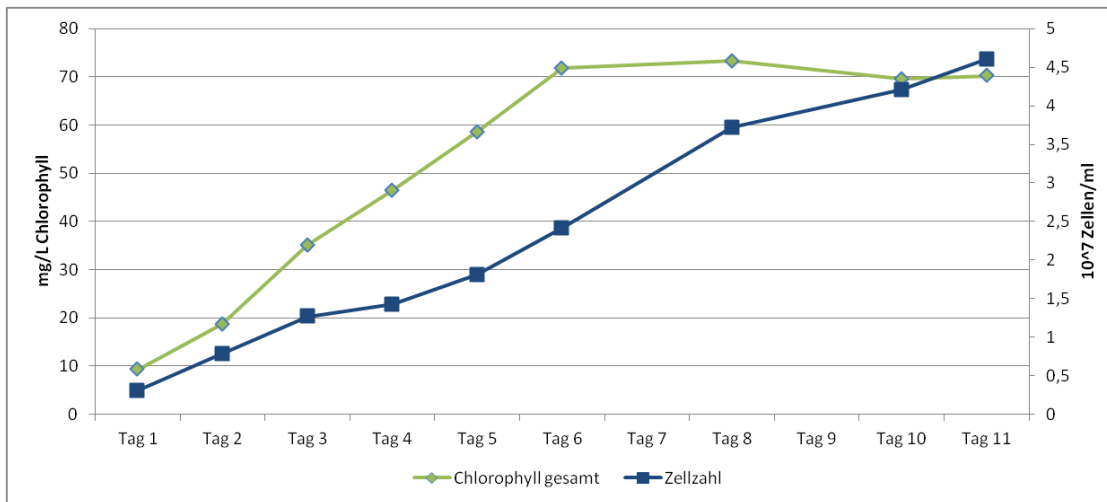
**Abb. 2:** Beispiel für die Darstellung der spezifischen Wachstumsrate für *S. obliquus*

Die ermittelten Wachstumskurven bildeten die Grundlage für die durchgeführten Versuche. Sie ermöglichen zum einen den Zeitpunkt einer Behandlung definieren und zum anderen Effekte auf das Wachstum der Kultur analysieren zu können.

Die Dokumentation erster Versuchsreihen ohne zusätzlichen UV-Einfluss zeigten, dass die pH-Werte des Algenmediums während der Wachstumsphase mit zunehmender Zellzahl deutlich über den als Optimum definierten Bereich von pH 7 bis 8,5 anstiegen. Eine Möglichkeit, diesem Effekt entgegenzutreten, ist die Zugabe von technischem CO<sub>2</sub>. Auswirkungen dieser Intervention wurden in Versuchsreihen für *Chlorella vulgaris* untersucht (siehe Arbeitspaket 6). In Folge dieser Versuchsreihen wurde festgelegt, dass alle weiteren Untersuchungen wieder ohne zusätzliches CO<sub>2</sub> erfolgen sollten, um Kombinationseffekte, die die Interpretation der Analyseergebnisse erschweren oder verwischen könnten, ausschließen zu können.

Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der Biotrockenmasse am Anfang und Ende des Versuches. Für die weitere Bewertung der Versuche wurden potentiell wirtschaftlich relevante Inhaltsstoffe (Protein-gehalt, Anteil der Fettsäuren Linol- und α-Linolensäure und Carotinoide (Lutein, β-Carotin, Astaxanthin) sowie der Gehalt von Chlorophyll a und b (über HPLC) zu ausgewählten Zeitpunkten durch die GMBU e. V., Fachsektion Dresden durchgeführt.

Um versuchsbegleitend bzw. zeitnah Aussagen über mögliche Veränderungen der Inhaltsstoffbildung in den Mikroalgen zu ermöglichen, wurde u.a. eine Methode zur Chlorophyllbestimmung mit Hilfe einer mehrstufigen methanolischen Extraktion nach Lichtenthaler und Buschmann (2001) erarbeitet. Die methanolische Extraktion mit anschließender photometrische Bestimmung ist nach den erhobenen Daten prinzipiell geeignet, um den Verlauf bzw. die Entwicklung der Kultur analog einer Wachstumskurve zu verfolgen (Abb. 3).



**Abb. 3: Verlauf Zellzahl und Chlorophyllgehalt bei *S.obliquus***

So ließ sich in Abhängigkeit vom Versuchsaufbau gegen Ende eines Versuches eine Sättigung der Chlorophyllbildung trotz weiterem Wachstum feststellen. Als problematisch ist jedoch die Unsicherheit der vollständigen Extraktion, da die entfärbten Überstände zum Teil noch eine gelbliche Färbung aufwiesen. Dies ist immer Hinweis auf eine unvollständige Extraktion. So brachte der Vergleich mit den Daten, die durch den GMBU e.V., Fachsektion Dresden erhoben wurden, Abweichungen hervor. Bei beiden Methoden gibt es jedoch Aufschlussprozesse bzw. Aufarbeitungsschritte wie die Gefrier-trocknung und Transportwege, die sich auch auf die Qualität und Quantität der Inhaltsstoffe auswirken kann. Bei der methanolische Extraktion kommt hinzu, dass eine Rückrechnung von mg Chlorophyll/l Algensuspension zu g Chlorophyll/g Biotrockenmasse über die ermittelte Biomasse erfolgt. Bestimmungsfehler, die bei der Bestimmung der Biotrockenmasse entstehen, werden so weiter verrechnet. Dennoch ist die Bestimmung des Chlorophyllgehaltes unter Beibehaltung beider Methoden zu empfehlen, um ablaufende Veränderungen rechtzeitig und zuverlässig zu identifizieren.

## **Arbeitspaket 2: Aufbau eines kompakten Mini-Labor-Versuchsreaktors zur Versuchsdurchführung**

Zur Versuchsdurchführung war die Entwicklung eines Mini-Labor-Reaktors notwendig, um die Wechselwirkungen zwischen der UV-Strahlung und dem Algenmedium kontrolliert eintreten lassen zu können. Die Konzipierung wurde in enger Abstimmung mit dem Kooperationspartner Fa. Neon Böhm durchgeführt. Zunächst wurden unterschiedliche mögliche Bauformen (z.B. Flächenstrahler, Punktstrahler, lineare und gefaltete Leuchtstofflampen) und Applikationsorte (z.B. außerhalb/innerhalb des Blasensäulenreaktors zur Algenkultivierung, Tauchstrahler) erarbeitet und auf Vorteile und mögliche Schwachstellen und Technologiefragen diskutiert (siehe Arbeitspaket 4 Fa. Neon Böhm). Ausschlaggebend für die Entscheidung einer Bypass-Lösung außerhalb des zur Kultivierung genutzten Blasensäulenreaktors gaben die Gegebenheiten des Kulturreaktors, die handhabbare förmliche Herstellung entsprechenden Strahlers sowie die Reproduzierbarkeit der Strahlergeometrie, die für einen definierten Strahlungseintrag in das Algenmedium zwingend gegeben sein muss.

Um den Forschungsfragen (z.B. die Prüfung der Wellenlängenbereiche UVA und UVB) Rechnung tragen zu können, wurde jedoch deutlich, dass die Entwicklung und Umsetzung mehrerer Versuchsreaktoren notwendig sein würde. Im Verlauf der Entwicklungsarbeiten wurde deutlich, dass sowohl

Materialwahl als auch Geometrien, abhängig von den durch die Hochschule definierten Strahlungsintensitäten und zu erzeugenden Wellenlängen, für die Fraktionen UVA und UVB notwendig sein würden. Untersuchungen zur effizienten Bestrahlung der Algenmedien ergaben aufgrund unterschiedlicher Absorption der Medien und zu dem erreichenden Toleranzbereich für die Bestrahlung unterschiedliche Durchmesser für die Medienführung an den UV-Quellen. In Konsequenz dieser Überlegungen und Prüfungen wurden marktverfügbare Glasmaterialien auf ihre Eignung gesichtet und in verschiedene Prototypen überführt.

### Arbeitspaket 3: Modifizierung der Stresssituation in Algen mittels pulsierender UV-Strahlung

Im Rahmen des FuE-Vorhabens wurden aufgrund entsprechender Literatur und vorhandenem Knowhow die Algenarten *Chlorella vulgaris* und *Scenedesmus obliquus* unter verschiedenen Belichtungskonzepten und Bestrahlungsregimen kultiviert (Abb. 4). Die eingetragene Strahlung durch die UV-Strahler wurde dabei durch die Geometrie der Bypass-Behandlungsreaktoren (Medienführung, Oberfläche zum Strahler), den eingesetzten Materialien (Borosilikatglas, Übergänge zum Natron-Kalk-Glas), den aus der Frequenz des eingesetzten elektronischen Vorschaltgerätes resultierenden Helligkeitsschwankungen, dem Leuchtstoffgemisch und der Dimmung des UV-Strahlers, die Durchflussgeschwindigkeit des wässrigen Algenmediums sowie die Behandlungsdauer und Behandlungsfolge variiert.

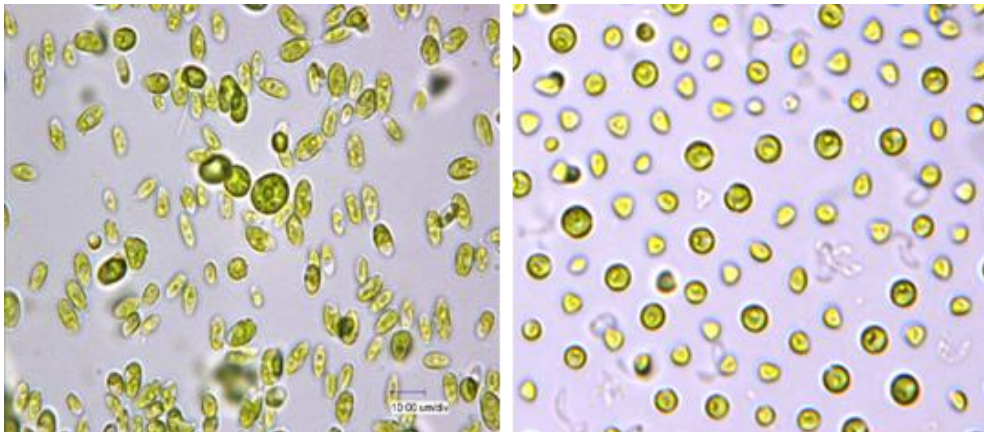


Abb. 4: mikroskopische Aufnahmen der Grünalgen *Scenedesmus obliquus* (links) und *Chlorella vulgaris* (rechts)

Die Ergebnisse zeigen, dass der Zeitpunkt der Behandlung, also vor bzw. während der Phase des exponentiellen Wachstums, im Abschnitt der Wachstumsverlangsamung oder während der stationären Phase, im Lebenszyklus einer Algenkultur von herausragender Bedeutung ist. Während die gewünschte Reaktion der Wachstumsstimulation durch induzierten moderaten UV-Stress eher in den frühen Phasen zu beobachten war und bei späterer Applikation zu negativen Entwicklungen der Zellzahl und der Optischen Dichte führte, ist die gezielte Anregung der Inhaltsstoffsynthese nur unmittelbar vor der Ernte der Grünalgen nachzuweisen. Als Grund dafür ist vermutlich die verhältnismäßig schnelle Zellteilungsrate von <20 Stunden, die den Einfluss von Stressereignissen in der Komposition der Inhaltsstoffe nach spätestens zwei Zellteilungszyklen in den Hintergrund treten lässt.

Während der Versuche im Blasensäulenreaktor mit angeschlossenem UV-Versuchsreaktor als auch parallel in den kleineren Reaktionsgefäßen ohne starke Gasdurchmischung durch aktiv eingeblasene



Sauerstoff- und Kohlendioxidversorgung wurden Ethylenmessungen durchgeführt. Dazu wurde der im Rahmen vorangegangener Forschungsprojekte Versuchsaufbau zur Messung der Ethylenemission höherer Pflanzen unter Stresseinfluss modifiziert. Im Mittelpunkt dieser Methode steht eine elektrokatalytische Messzelle mit nanoporöser Goldanode. Die Messzelle wird in definierbaren Zeitabständen (Minimum 105 Sekunden) von einer angesaugten Gasprobe umspült und die Spannungsveränderung an der sensiblen Oberfläche in absolute Ethylenmesswerte übertragen. Es war jedoch weder unter moderaten noch unter unverhältnismäßigem UV-Stress möglich, spezifisch auf Stresszustände schließende Messwerte zu erfassen. Gründe hierfür sind eher in der Versuchsanordnung bzw. in der Messmethode zu suchen, als an fehlender Emission durch die Algen. Zum einen besitzt das Messgerät Querempfindlichkeiten zu anderen Gasen

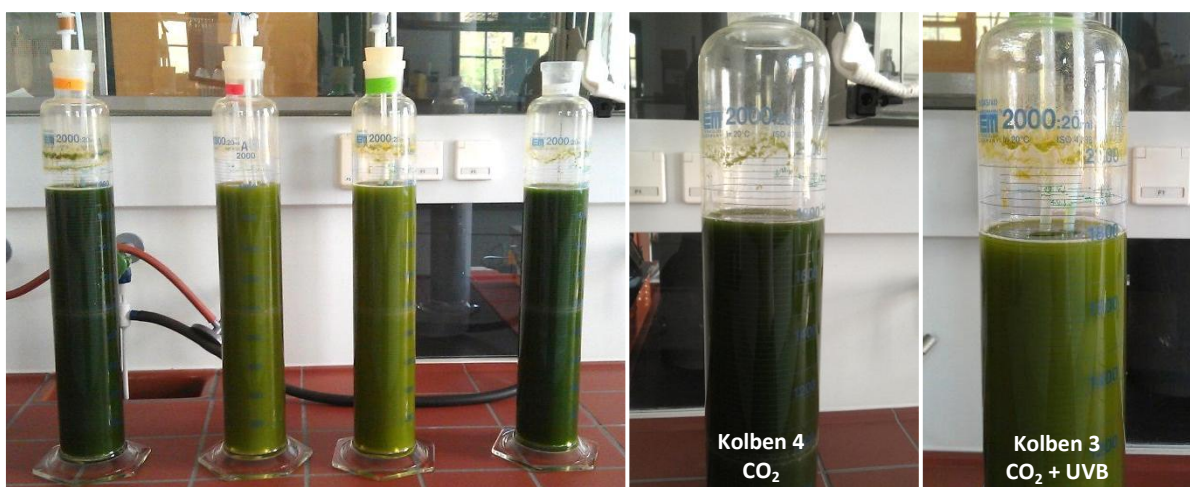
Modell zur Darstellung der Einflussgrößen (beeinflussbare Parameter und Bedingungen) zur Nutzung von gezieltem, reproduzierbarem Stress (abiotisch generell und speziell durch UV)

#### **Arbeitspaket 4: Untersuchung der Abgabe von Wirkstoffen durch die Algen mittels gepulster UV-Strahlung in das umgebende Nährmedium**

Im Rahmen des Forschungsvorhabens wurde während der durchgeführten Bestrahlungsversuche mit zwei Algenarten die Abgabe von potentiell nutzbaren Wirkstoffen in das umgebende Nährmedium begleitend dokumentiert. Die eingetragene Energie in Form von UV-Strahlung wurde dabei durch definierte Wellenlängen, Dimmung, Durchflussgeschwindigkeit, Behandlungsdauer sowie die Veränderung weiterer Wachstumsparameter wie beispielsweise  $\text{CO}_2$ -Verfügbarkeit und Tageslängen variiert. Im Wesentlichen sind dabei zwei Effekte in unmittelbarer Erscheinung getreten, die durch Durchführung entsprechender Analytik erklärt und bestätigt werden konnten.

##### *Lipidbildung und Ausschüttung*

Nach entsprechender Behandlung mit UV-Strahlung in Kombination mit erhöhter  $\text{CO}_2$ -Gabe (10.000 ppm) konnte eine deutliche Lipidbildung festgestellt werden. Diese zeigte sich durch Gelbfärbung des Mediums und der Algen in einer Ausprägung, die problemlos visuell zu erfassen war (Abb. 5).



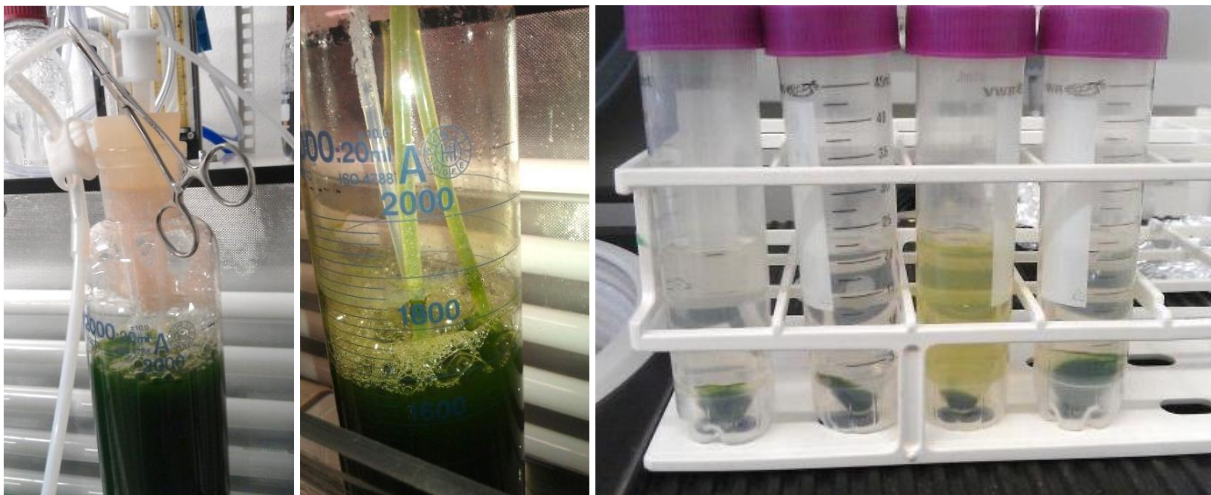
**Abb. 5: Lipidbildung von *S. obliquus* der Kolben 2 und 3 nach Behandlung mit UV-Strahlung und zusätzlichem  $\text{CO}_2$**



Die Lipidbildung findet unter Abbau von Chlorophyll statt. Sie kann üblicherweise durch Lichtstress (Übersorgung durch zu hohe Intensitäten und/oder fehlender Nachtunterbrechung) im VIS- bzw. PAR-Bereich als auch durch Nährstoffmangel (insbesondere Stickstoffmangel) hervorgerufen werden. Eine Einfachwirkung eines dieser Stressoren konnte durch die Versuchskonzeptionierung jedoch ausgeschlossen werden, sodass die Lipidbildung und -ausschüttung in das Medium der Kombinationswirkung von erhöhter Verfügbarkeit des Nährstoffs Kohlenstoffdioxid und der durchgeführten UVB-Behandlung zugeordnet werden kann.

### *Schaumbildung*

Während länger andauernder Bestrahlungsversuche (>12 Stunden) und im Nachgang intensiver UV-Einwirkung trat das Phänomen der Schaumbildung auf. Die Schaumbildung wies unterschiedliche Färbung auf. Die in Abbildung 6 zu erkennende leichte Rotfärbung deutet auf den Einfluss von Carotinoiden hin, während die sich in Abbildung 7 abzeichnende Grünfärbung auf austretendes Chlorophyll durch Zellaufschluss schließen lässt. Der Verdacht des Aufschlusses von Zellen wurde zudem durch die Grünfärbung des Überstandes nach dem Zentrifugieren im Rahmen der Probenaufbereitung bestätigt. Zudem zeigte sich eine deutliche Volumenabnahme des Pellets, der durch das Zentrifugieren entsteht (Abb. 8).



**Abb. 6: rote Schaumbildung** **Abb. 7: grüne Schaumbildung** **Abb. 8: Verfärbung des Überstands; Volumenänderung des Pellets**

Eine Einflussnahme auf die Überstandsverfärbung und die veränderte Pelletbildung durch die Probenaufbereitung (Waschung und Zentrifugation) kann ausgeschlossen werden.

Im Allgemeinen wird die Schaumbildung in Algenkulturen durch Zellaufschluss und dem resultierenden Austritt von Proteinen hervorgerufen. Die freigesetzten Proteine beeinflussen dabei die Oberflächenaktivität des wässrigen Mediums und führen in Kombination mit der aktiven Belüftung bzw. Begasung zur Schaumbildung. Dem Zellaufschluss liegen dabei zwei Mechanismen zu Grunde. Zum einen könnte es sich um Aufschluss durch mechanisch ausgeübten Druck handeln, wie man ihn auch in üblichen Aufschlussverfahren zu Nutze macht. Dieser müsste jedoch relativ stark sein, um ein solch hohen Grad an Aufschluss zu erzeugen. Wahrscheinlicher ist, dass die Bestrahlung der Algenzellen zu einer Schwächung der Zellwand geführt hat, die in Kombination mit dem durch Pumpprozesse entstehenden mechanischen Stress letztlich zum Aufschluss geführt hat. Quantitative bzw. qualitative Aussagen zu Veränderungen in der Carotinoidbildung konnten nicht getroffen werden.

## Arbeitspaket 5: Untersuchung der Nutzung der UV-Strahlungseffekte zur Verstärkung der Widerstandsfähigkeit der Algen gegenüber Pilzen und Bakterien

Die Untersuchung der Wechselwirkung von UV-Strahlung und den algenartspezifischen bakteriellen Antagonisten zeigte lediglich relativ unspezifische Tendenzen auf. Die Überwachung der Auswirkungen der verschiedenen Behandlungsmodi erfolgte sowohl direkt im Algenmedium in Form von mikroskopischen Begleituntersuchungen als auch in Form von Petrischalenversuchen.

Das fortlaufende mikroskopische Monitoring des bakteriellen Fremdbesatzes zeigte generell eine Tendenz zur Ausbreitung der Bakterien während der intensiven Algenkultur. Dies ist den beinahe deckungsgleichen Wachstumspräferenzen der Mikroalgen und den unvermeidlich in der Kultur befindlichen Bakterienstämmen als auch den intensiven Beprobungs- und Untersuchungseingriffen in die Kulturgefäße zuzuschreiben. Trotz Einhaltung der sich aus der guten Laborpraxis ergebenden Hygienemaßnahmen ist es ohne die Durchführung in Reinräumen praktisch unvermeidbar, dass es zu Kontamination mit Bakterien u.a. aus der Umgebungsluft kommt.

Begleitend durchgeführte Ausstriche auf PCA-Agar (1:10.000 in 0,45% physiologischer NaCl-Lösung) ergaben ein unspezifisches Bild hinsichtlich des Zusammenhangs von Behandlung und der Anzahl kolonienbildender Einheiten. Tendenzen zur Unterdrückung der Vermehrung von Bakterien im Algenmedium waren nur während intensiver UV-Behandlungen (Dauer >12 Stunden bzw. Wiederholungsbehandlung mit UVB-Strahlung) erkennbar (Abb. 9).

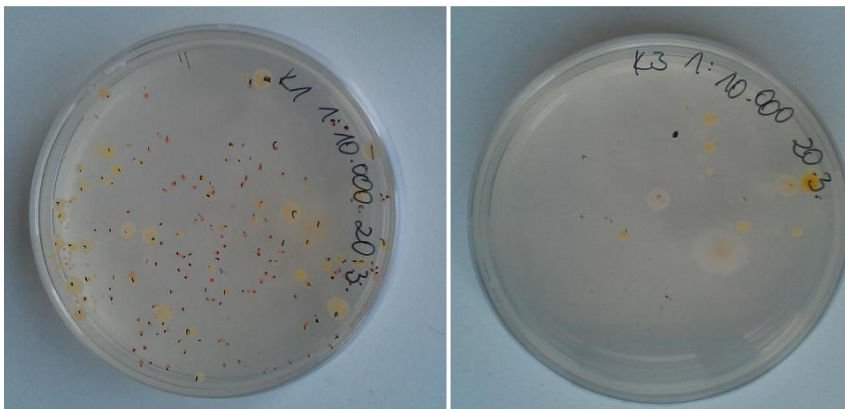


Abb. 9: Bakterienausstriche auf PCA-Agar eine UV-behandelten und einer unbehandelten Algenkultur

Der Eindruck der Suppression war nicht in jedem Falle reproduzierbar und konnte somit nicht objektiv statistisch nachgewiesen werden. Zudem waren in diesen Versuchsmodi auch negative Effekte hinsichtlich des Algenwachstums festzustellen. Auch hier ist festzustellen, dass die weitestgehend deckungsgleichen Anforderungen der Mikroalgen und der begleitenden Bakterien an die Umweltbedingungen wie Temperatur, Licht und Nährstoffverfügbarkeit zu überlagernden bzw. gleichlaufenden Effekten führen. Die entscheidenden Erfolgsfaktoren für eine hochgradig reine, durch hohes Wachstum und hochwertige Inhaltsstoffproduktion gekennzeichnete Algenkultur in Photobioreaktoren sind penibel sauber gehaltene Erhaltungs- und Vermehrungszuchten als Ausgangsmaterial und die strenge Einhaltung von Hygienemaßnahmen während der intensiven Kultur.

## Arbeitspaket 6: Untersuchung des Einflusses äußerer Parameter auf die UV-Verfahren

Im Rahmen dieses Arbeitspakets wurden insbesondere drei äußere Parameter, die das Algenwachstum in Photobioreaktoren maßgeblich beeinflussen können eingehend dokumentiert. Im Folgenden wird auf Versuchsreihen zu zusätzlicher Zuführung von CO<sub>2</sub>, kontinuierlicher Belichtung und Einsatz von schmalbandigeren LED-Leuchten eingegangen.

### Erhöhte CO<sub>2</sub>-Level

Der Zugang zu Kohlenstoffdioxid kann unter definierten Umgebungen, wie sie in Photobioreaktoren unter Kunstlichtbedingungen vorliegen, zu einem limitierenden Faktor für das Wachstum werden. Zudem ist es möglich, durch die sauer wirkende Eigenschaft auf wässrige Medien, pH-Wert-Korrekturen durchzuführen. Bei den unter natürlichen CO<sub>2</sub>-Anteilen der Umgebungsluft (360 bis 400 ppm) durchgeführten Versuchen zeigte sich, eine deutliche Erhöhung des pH-Werts mit zunehmender Zellzahl. Das Optimum des pH-Werts liegt jedoch für die meisten Grünalgenarten zwischen 7 und 8,5.

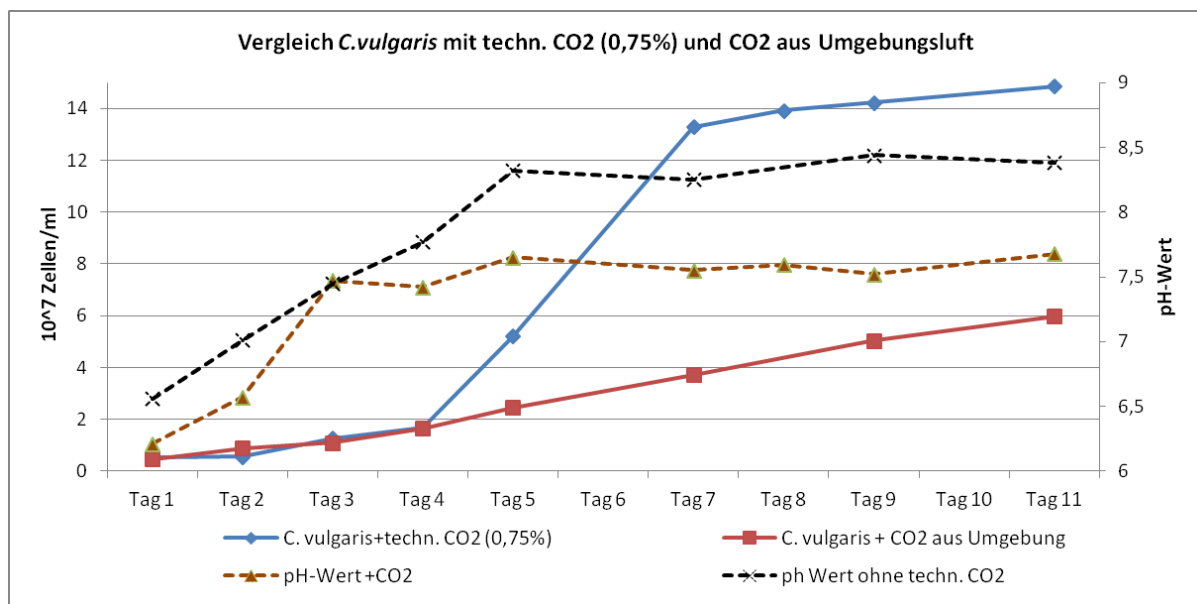


Abb. 10: Wachstumskurve und pH-Wert bei Zugabe von technischem CO<sub>2</sub>

In den Versuchen mit *Chlorella vulgaris* erwies sich die Zugabe von 7500 ppm (0,75 %) CO<sub>2</sub> als vorteilhaft, um den pH-Wert zwischen 7 und 8 während der Versuche zu stabilisieren. Wie in Abbildung 10 ersichtlich, stabilisiert sich der pH-Wert ohne die Zuführung von techn. CO<sub>2</sub> scheinbar ab Tag 5. Die Abbildung täuscht jedoch insofern, dass die abgetragenen Werte zu Beginn der Tagphase erfasst wurden. Jedoch steigt der pH-Wert im Laufe der Tagphase auf über 11 an (nicht dargestellt) und sinkt während der sich anschließenden Nacht wieder. Durch die Zugabe von technischem CO<sub>2</sub> ist der pH-Wert jedoch auch während der Tagphase stabil zu halten.

Die Ergebnisse für *Chlorella vulgaris* zeigten, dass bei einem 14/10 Stunden Tag-/Nachtzyklus der Biotrockenmassegehalt bei einem Zusatz von technischem CO<sub>2</sub> bei unverändertem Nährmedium um ca. 200% stieg. Gleichzeitig sanken aber die Protein-, Lutein-,  $\beta$ -Carotin- und Astaxanthingehalte um ca. 60-70% und der Chlorophyllgehalt um fast 80%. Der Anteil der Fettsäuren Linol- und  $\alpha$ -Linolensäure verringerte sich deutlich geringer, zeigte jedoch ohnehin eine hohe Schwankungsbreite (Tab 2).

Tab. 2: Gegenüberstellung Einfluss CO<sub>2</sub> auf Inhaltsstoffe von *Chlorella vulgaris* (14/10 Tag/Nachtzyklus, Tag 11)

	ohne technisches CO <sub>2</sub>		mit technischem CO <sub>2</sub>		Differenz [%]
	Mittelwert	STABW	Mittelwert	STABW	
<b>Biomasse [g/l]</b>	1,56	0,33	4,41	0,37	+ 182,7
<b>Proteine*</b>	36,52	6,02	10,53	1,46	- 71,2
<b>Lutein*</b>	0,36	0,05	0,14	0,015	- 61,1
<b>β-Carotin*</b>	0,09	0,01	0,037	0,006	- 58,9
<b>Astaxanthin*</b>	0,03	0,01	0,01	0	- 66,7
<b>Linol- und α-Linolensäure*</b>	2,57	0,35	2,39	0,33	- 7,0
	2,27	0,58	1,76	0,31	- 22,5
<b>Chlorophyll a*</b>	3,27	0,40	0,74	0,18	- 77,4
<b>Chlorophyll b*</b>	1,27	0,12	0,30	0,07	- 76,4

\* Angaben in g/100 g

Um mögliche Effekte durch die UV-Behandlung und Lichtintensitäten bzw. -qualitäten klarer darstellen zu können, erfolgten die weiteren Versuche wieder ohne zusätzliches CO<sub>2</sub>. Eine weitere Option für zukünftige Versuche ist eine Nährmedienanpassung bei zusätzlichem CO<sub>2</sub>, da diese durch die höhere Biotrockenmasse-Produktivität schneller aufgebraucht und damit schneller limitierend wirken. Ein Nährstoffmangel könnte wiederum auch gezielt induziert/genutzt werden, um die Syntheserate von Reservestoffen (Proteine/Kohlenhydrate) zu erhöhen.

#### *Versuche zur Tageslichtlänge/kontinuierliche Belichtung*

Als generelles Ergebnis der Untersuchung unterschiedlich langer Tagphasen lässt sich festhalten, dass die Reaktionen der Mikroalgen hinsichtlich des Wachstumsverhaltens und des Chlorophyll-Carotinoid-Verhältnisses artspezifisch auf Tag/Nacht-Zyklen erfolgen.

Kulturen mit *C. vulgaris* erreichten ein Wachstumsmaximum und die höchste Biomassebildung unter kontinuierlicher Belichtung bzw. unter einer kurzen Nachtphase von nur 2 Stunden pro Tag. Der höchste Biomassertrag wurde bei *S. obliquus* ebenfalls unter kontinuierlicher Belichtung festgestellt. Zusätzlich kam es bei *S. obliquus* kam es zu einer deutlich früher eintretenden Stickstofflimitierung mit verlängerter Tagphase, wodurch die normalerweise durch zwei Wachstumsschübe gekennzeichnete Wachstumskurve gestreckt wurde und insbesondere der zweite Anstieg der Kurve verspätet eintrat. Im Vergleich zu einem üblichen Tag-Nacht-Zyklus von 14 zu 10 Stunden konnte für *Chlorella* ein 1,7-facher und für *Scenedesmus* ein 1,5-facher Biomassertrag erfasst werden. Bezieht man das zur Verfügung gestellte tägliche Lichtintegral in die Überlegungen ein, so wird deutlich, dass während der kontinuierlichen Belichtung eine geringere Konversion von Lichtenergie zu Biomasse stattgefunden haben muss. Es wird deshalb vermutet, dass ein größerer Teil der Lichtenergie von der Alge ungenutzt in Wärme umgewandelt oder in andere metabolische Prozesse investiert wurde. Eine Verschlechterung der Photosyntheseleistung aufgrund fehlender Nachtphase unterdrückter oder erschwert ablaufender enzymatischer Prozesse ist unter kontinuierlicher Belichtung ebenfalls nicht auszuschließen. Das ökologische Maximum scheint demnach unter kontinuierlicher Belichtung der ausgewählten Grünalgen erreicht zu wurden. Je nach Zweck der Algenkultur ist jedoch festzuhalten, dass das ökonomische Optimum unter Wahrung kürzerer Tageslängen erreicht wird.

### Versuche mit LED-Technologie

Deutlich zu erkennen ist, dass sowohl in Bezug zum Wachstumsparameter optische Dichte (OD) (Abb. 11) als auch Zellgröße (Abb. 12) unter LED-Einfluss höhere Werte erzielt werden konnten (Kolben 1 und 2), als im direkten Vergleich mit der statischen Belichtung durch Leuchtstofflampen (Kolben 3 und 4).

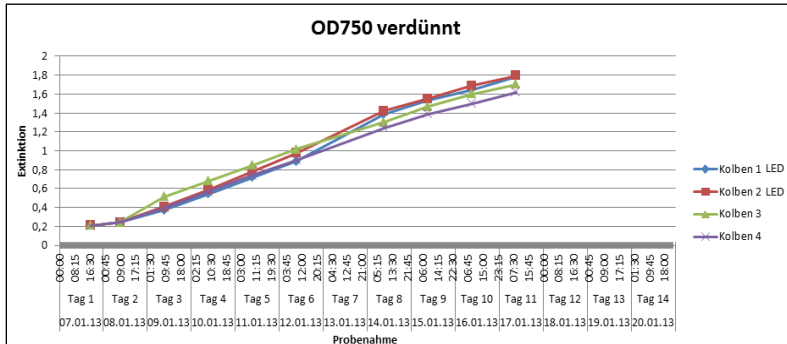


Abb. 11: Darstellung des Wachstumsparameters Optische Dichte für den LED-Tastversuch vom 07.01.2013 bis 17.01.2013

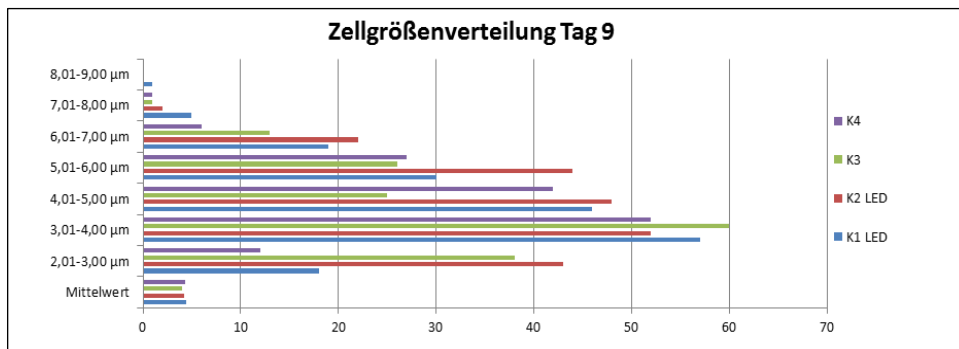


Abb. 12: Darstellung der Zellgrößenverteilung für den Tag 9 des LED-Tastversuchs vom 07.01.2013 bis 17.01.2013

In die Tests zum Einsatz von LED-Leuchten für die Algenkultivierung wurden blaue, grüne und hellrote Wellenlängenbereiche einbezogen. Es erfolge ein direkter Vergleich zur Belichtung mit Leuchtstofflampen mit einem 14:10 Stunden Belichtungsprogramm. Die Ergebnisse zeigen, dass die verschiedenen Mikroalgen spezialisiert unterschiedlich auf die gegebenen rot bzw. rot/blau Anteile reagieren. Welcher Anteil an grünem Licht sinnvoll sein kann (grünes Licht penetriert Bestände besser und regt Carotinoide zum Stoffaufbau an), konnte nicht erarbeitet werden.

Beispielhaft für die große Bandbreite an möglichen Reaktionen auf spezifische Belichtungsqualitäten soll an dieser Stelle die monochromatische Belichtung im roten Spektralbereich (Peak um 645 nm) im Vergleich zur Leuchtstofflampenbelichtung dargestellt werden.

Tabelle 3 zeigt eine etwa gleich hohe Biomasse- und Zellzahlkonzentration sowie optische Dichte für *C. vulgaris*, jedoch mit geringeren Gehalten von Carotinoiden (Lutein (-37%),  $\beta$ -Carotin (-44%)), sowie geringeren Anteilen von Chlorophyll in LED belichteten Proben. Im Gegensatz dazu stehen die um 28% höheren Proteinanteile.

Die Ergebnisse zu *S. obliquus* (Tab. 4) zeigen ein prinzipiell schwächeres Wachstum an Hand der 22% geringeren Biomasse und 19% geringeren Zellzahl der LED belichteten Kulturen zu denen mit Leuchtstoffröhren belichteten Kulturen. Deutlich geringere Anteile der untersuchten Inhaltsstoffe (Proteine, Carotinoide und Chlorophyll) wiesen die LED belichteten Kulturen ebenfalls auf.

**Tab. 3: Gegenüberstellung der Versuchsergebnisse zur Belichtung durch LED bzw. Leuchtstofflampen für *C. vulgaris***

	BTM	Protein	Lutein	β-Carotin	OD750	Zellzahl	Chla	Chlb	Chl g	Carotinoide
	g/L	g/100g TM				10 <sup>7</sup> Zellen/mL	μg/ml			
LED rot	1,37	41,60	0,25	0,05	1,911	5,571	42,69	13,03	60,74	11,27
Leuchtstoff	1,35	32,33	0,40	0,09	2,017	5,697	49,82	14,69	70,35	14,11

BTM = Biotrockenmasse, TM = Trockenmasse, OD750 = optische Dichte gemessen bei 750 nm

LED n=2; Leuchtstoffbelichtung n=4

**Tab. 4: Gegenüberstellung der Versuchsergebnisse zur Belichtung durch LED bzw. Leuchtstofflampen für *S. obliquus***

	BTM	Protein	Lutein	β-Carotin	OD750	Zellzahl	Chla	Chlb	Chl g	Carotinoide
	g/L	g/100 g TM				10 <sup>7</sup> Zellen/mL	μg/ml			
LED rot	1,28	47,75	0,28	0,05	1,704	2,525	34,01	11,92	49,83	9,00
Leuchtstoff	1,65	32,34	0,32	0,06	2,208	3,132	49,20	15,42	70,70	14,00

BTM = Biotrockenmasse, TM = Trockenmasse, OD750 = optische Dichte gemessen bei 750 nm

LED n=2; Leuchtstoffbelichtung n=6

Weitere Untersuchungen müssten erfolgen, um die entsprechenden Optima im Hinblick auf das Wachstum bzw. Inhaltsstoffsynthese zu identifizieren. Vorteile der LED Technik wie die hohe elektrische Umwandlungseffizienz, suffiziente Lichtintensitäten, ein kleines Volumen-Gewichtsverhältnis sowie die lange Lebenszeit machen die Technik zu einer interessanten Möglichkeit, die Algenkultivierung unter kontrollierten Bedingungen zu optimieren und damit wirtschaftlicher zu gestalten. Die Möglichkeiten der LED-Belichtung hinsichtlich der positiven Veränderung wertgebender Inhaltsstoffe, eines beschleunigten Wachstumsverhaltens bei gleichzeitig optimiertem Energieeinsatz haben sich im Ansatz bestätigt, müssten jedoch in Folgeversuchen vertieft werden, um verlässliche Belichtungsprogramme mit quantifizierbaren Effekten entwickeln zu können.

#### **Arbeitspaket 7: Simulation der Effizienz für unterschiedliche Bestrahlungsmethoden. Erstellen einer Datenbank für effektive Strahlungsmodi und die Algenarten**

Um die Verwertung der Ergebnisse sicherzustellen, wurde eine Datenbank erstellt. Diese Sammlung von Versuchsdaten inkl. sämtlicher relevanter Parameter, Analyseergebnisse und besonders relevanter Literatur wurde über die Nutzung des Google-Dienstes Drive zugänglich gemacht. Das Netzwerk-Dateisystem ermöglicht die Synchronisation von Dateien zwischen verschiedenen Rechnern und Benutzern und erfüllt damit gleichzeitig eine Online-Datenspeicherung bzw. -sicherung. Der Zugriff auf die Daten ist damit ort- und zeitunabhängig möglich. Da in Kooperation zwischen der Hochschule und dem Partner Fa. Neon Böhm weitere Forschungsaufgaben bearbeitet werden, wird die Datenbasis gepflegt und entwickelt sich stetig weiter. Die dahinter liegenden Modelle werden damit ebenfalls beständig geprüft und ggf. neu fokussiert.



## Erfolge und geplante Veröffentlichungen

- Hüber Y. 2014. Untersuchungen zum Einfluss unterschiedlicher Belichtungszyklen auf das Wachstumsverhalten von Mikroalgen zur Steigerung der Biomasse, sowie des Chlorophyll- und Carotinoidgehaltes am Beispiel von *Scenedesmus obliquus*. Masterarbeit. Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden. Fakultät Landbau/Landespflege.
- Peter J. 2012. Eignung von Mikroalgen zur Produktion und Verwertung von Biogas. Bachelorarbeit. Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden. Fakultät Landbau/Landespflege.
- Schadt E. 2014. Der Einfluss von Licht auf die Mikroalgenkultivierung. Betreute Projektarbeit. Martin-Andersen-Nexö-Gymnasium Dresden.
- Scharff C. 2013. Use of algae as renewable resources - potential and perspectives of the green cell factories. Center for Environment, Health and Field Sciences, Chiba University, 10th Anniversary International Symposium 2013, Chiba/Japan.
- Scharff C. 2014. Use of algae as renewable resources - potential and perspectives of the green cell factories. ZNFE Workshop, Karoly- Robert Universität, Gyöngyös/Ungarn.
- Scharff C. 2015. Promotionsverfahren zum Einfluss elektromagnetischer Strahlung auf Wachstums- und Stoffwechselprozesse bei Mikroalgen der Klasse Chlorophyceae“, Kooperation zwischen Martin-Luther-Universität Halle und der HTW Dresden (Fertigstellung 2015).
- Scharff C., Domurath N., und Schroeder F.-G. 2014. Influence of electromagnetic radiation to enhance the growth of the green algae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus*. 29th International Horticultural Congress, Brisbane/Australien (in press).
- Scharff C., Schroeder F.-G. und Diepenbrock W. 2012. The Use of High-Frequency Electromagnetic Radiation for an Increased Productivity of Microalgae in Closed Systems - a Concept. International Conference and Exhibition on Soilless Culture, Shanghai/China (veröffentlicht in: Proceedings of the International Symposium on Soilless Cultivation, number 1004, editor W. Zhu, Q. Li, S. 93-99).
- Storm A. 2012. Untersuchungen der Schwermetalladsorption durch devitale Algenbiomasse in Prozessabwässern der elektrolytischen Oberflächenbehandlung. Bachelorarbeit. Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden. Fakultät Landbau/Landespflege.
- Ziegler K. 2012. Untersuchung des Einflusses der Medienzusammensetzung auf das Wachstumsverhalten von Mikroalgen zur Etablierung einer stabilen Kultur am Beispiel von *Chlorella vulgaris*. Masterarbeit. Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden. Fakultät Landbau/Landespflege.