

Schlussbericht vom 23.02.2024

zu IGF-Vorhaben Nr. 21704 N

Thema

Mikroalgen zur Reinigung von Papierabwasser mit gleichzeitiger Gewinnung von Lipiden als Grundlage für Biokunststoffe und Biobrennstoffe

Berichtszeitraum

01.03.2021 - 31.08.2023

Forschungsvereinigung

Kuratorium für Forschung und Technik der Zellstoff- und Papierindustrie im VDP e.V.

Forschungseinrichtung(en)

FE 1 - Technische Universität Darmstadt, Fachgebiet Papierfabrikation und Mechanische Verfahrenstechnik (PMV)

FE 2 - Hochschule Darmstadt - Fachbereich Chemie- und Biotechnologie, Fachgebiet Bioverfahrenstechnik (HDA)

Gefördert durch:

Zusammenfassung

Eine der größten globalen Herausforderungen des 21. Jahrhunderts besteht darin, in Zeiten des Klimawandels eine wachsende Weltbevölkerung nachhaltig mit Nahrungsmitteln, Rohstoffen und Energie zu versorgen. Pflanzen können mit Hilfe von Sonnenlicht und CO₂ aus der Atmosphäre Biomasse erzeugen und somit fossile Rohstoffe auf umweltfreundliche Art und Weise ersetzen. Die Kultivierung von Mikroalgen könnte dabei eine große Rolle spielen, denn sie steht nicht in Konkurrenz zu landwirtschaftlichen Flächen.

Im Rahmen des vorliegenden Forschungsvorhabens konnte gezeigt werden, dass biologisch gereinigtes Papierfabriksabwasser ein geeignetes Medium zur Anzucht von Mikroalgen ist. Die Zugabe eines Nährmediums war zur optimalen Versorgung der Mikroalgen erforderlich, da in dieser Abwasserreinigungsstufe nur geringe Nährstoffkonzentrationen zu erwarten sind. Bei Screening-Untersuchungen wurde im Vergleich zwischen vier Mikroalgen mit dem Stamm *Scenedesmus acuminatus* die höchste Produktivität erreicht. In einem geeigneten Reaktor mit Beleuchtung und CO₂-Begasung konnte aus dieser Mikroalge innerhalb von elf Tagen knapp 7 g/L Biomasse gewonnen werden, die durch ihren Lipidgehalt und die Lipidzusammensetzung ein hohes Potenzial zur Herstellung von Biokraftstoffen und Biokunststoffen hat. Rückstände von endokrin wirksamen Substanzen wie Bisphenol A oder Diethylhexylphthalat wurden parallel dazu um mehr als 60 % bis unter die Bestimmungsgrenze des Messverfahrens reduziert. Die Hochskalierung der Mikroalgenkultivierung vom Labormaßstab (10 mL-Reaktoren) in den Technikumsmaßstab (6 L-Photobioreaktoren) ist nach Anpassung der verfahrenstechnischen Parameter erfolgreich verlaufen.

Innerhalb des Projekts wurden wertvolle Erkenntnisse zu den optimalen Wachstumsbedingungen verschiedener Mikroalgenstämme dokumentiert und verfahrenstechnische Möglichkeiten zur weiteren Optimierung der Lipidbildung untersucht und bewertet. Zusätzlich wurden verfahrenstechnische Methoden zum Aufschluss der Biomasse und chemische Untersuchungsmethoden für die Untersuchung der Zusammensetzung der Biomasse auf den konkreten Anwendungsfall getestet und entsprechend angepasst.

Trotz der vielversprechenden Forschungsergebnisse weist das Algensystem noch eine deutlich negative Energie- und Kostenbilanz auf. Die weitere Optimierung des Verfahrens wird im Rahmen eines Folgeprojektes angestrebt.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Wissenschaftlich-technische und wirtschaftliche Problemstellung	6
1.1 Ausgangssituation	6
1.2 Stand der Forschung und Entwicklung	7
1.2.1 Algen-Kulturen zur Abwasserreinigung	7
1.2.2 Betrieb der Algen-Reaktoren	8
1.2.3 Charakterisierung der Papierfabrikabwässer und Anforderung an die Beschaffenheit	10
1.2.4 Mikroalgen zur Abwasserreinigung in der Papierindustrie	11
1.2.5 Toxikologische Untersuchungen zur Charakterisierung des Abwassers	12
1.2.6 Produktion von Lipiden und Biobrennstoffen aus Algen	13
2 Forschungsziel und Lösungsweg	14
2.1 Forschungsziel	14
2.2 Lösungsweg zur Erreichung des Forschungsziels	15
2.2.1 Arbeitspaket 1: Recherche, Auswahl und Beschaffung geeigneter Mikroalgenspezies	15
2.2.2 Arbeitspaket 2: Auswahl und Voruntersuchung geeigneter Papierfabrikabwässer	15
2.2.3 Arbeitspaket 3: Untersuchungen zum Wachstum von Mikroalgen in verschiedenen Papierfabrikabwässern und Optimierung der Versuchsdurchführung im Labormaßstab	16
2.2.4 Arbeitspaket 4: Untersuchung des Wachstums der Mikroalgen im Labormaßstab und Bewertung der Clearance-Kapazität	16
2.2.5 Arbeitspaket 5: Untersuchung des Wachstums im Technikumsmaßstab und Bewertung der Clearance-Kapazität	17
2.2.6 Arbeitspaket 6: Produktion von Lipiden aus Mikroalgen	18
2.2.7 Arbeitspaket 7: Up-Scaling, Vergleich der Testergebnisse im Labor- und Technikumsmaßstab und Kostenabschätzung	19
2.2.8 Arbeitspaket 8: Dokumentation und Berichterstattung	20
2.3 Personaleinsatz, Geräte und Leistungen Dritter	20

2.3.1	FE 1: TU Darmstadt, PMV	20
2.3.2	FE 2: Hochschule Darmstadt.....	20
3	Versuchsdurchführung und Ergebnisse	21
3.1	Arbeitspaket 1: Recherche, Auswahl und Beschaffung geeigneter Mikroalgenspezies	21
3.1.1	Literaturrecherche	21
3.1.2	Algenanzucht.....	24
3.1.3	Erste Versuche zur Lipidbildung	28
3.1.4	Zusammenfassung AP 1	30
3.2	Arbeitspaket 2: Auswahl und Voruntersuchung geeigneter Papierfabriksabwässer.....	30
3.2.1	Chemische Analytik	31
3.2.2	Summenparameter Endokrine Wirkung.....	33
3.2.3	Algenwachstum in Abwasserproben.....	36
3.2.4	Zusammenfassung AP 2	42
3.3	Arbeitspaket 3: Untersuchungen zum Wachstum von Mikroalgen in verschiedenen Papierfabriksabwässern und Optimierung der Versuchsdurchführung im Labormaßstab	43
3.3.1	Optimierung der Versuchsdurchführung.....	43
3.3.2	Zweiphasige Kultivierung.....	47
	* Störung durch sehr hohe Chlorid-Gehalte möglich	51
3.3.3	Zusammenfassung AP 3	51
3.4	Arbeitspaket 4: Untersuchung des Wachstums der Mikroalgen im Labormaßstab und Bewertung der Clearance-Kapazität	52
3.4.1	CSB-Wert	52
3.4.2	Abbau endokrin wirkender Einzelstoffe	57
3.4.3	Zellaufschluss Mikroalgen	62
3.4.4	Zusammenfassung AP 4	64
3.5	Arbeitspaket 5: Untersuchung des Wachstums im Technikumsmaßstab und Bewertung der Clearance-Kapazität	65
3.5.1	Algenwachstum im Technikumsmaßstab	65
3.5.2	Bewertung der Clearance-Kapazität.....	71
3.5.3	Zusammenfassung AP 5	73

3.6	Arbeitspaket 6: Produktion von Lipiden aus Mikroalgen	73
3.6.1	Extraktion der Lipide aus der Biomasse	74
3.6.2	Chemische Analyse der gebildeten Fettsäureester	77
3.6.3	Anpassung der Stressbedingungen für die Lipidproduktion	81
3.6.4	Zusammenfassung AP 6	83
3.7	Arbeitspaket 7: Up-Scaling, Vergleich der Testergebnisse im Labor- und Technikumsmaßstab und Kostenschätzung	84
3.7.1	Algenernte mittels Tellerseparator.....	84
3.7.2	Prozessbilanzierung	86
4	Fazit	89
5	Wirtschaftliche Bedeutung der Forschungsergebnisse für kleine und mittlere Unternehmen (KMU).....	90
5.1	Voraussichtlicher Nutzen der Forschungsergebnisse	90
5.2	Voraussichtlicher Beitrag zur Steigerung der Wettbewerbsfähigkeit.....	91
5.3	Aussagen zur voraussichtlichen Umsetzung der FuE-Ergebnisse.....	91
6	Maßnahmen zum Ergebnistransfer	92
7	Danksagung	95
	Literaturverzeichnis	96

Abkürzungsverzeichnis

AOX	Adsorbierbare organisch gebundene Halogene
AP	Arbeitspaket
ARA	Abwasserreinigungsanlage
BG	Bestimmungsgrenze
BG11	<i>Blue-Green Medium</i>
Bis F	Bisphenol F
BPA	Bisphenol A
BSA	Bovines Serumalbumin
CSB	chemischer Sauerstoffbedarf
COD	<i>chemical oxygen demand</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDC	<i>endocrine disrupting chemical</i>
EE ₂	Ethinylestradiol
FAME	Fettsäuremethylester (<i>fatty acid methyl ester</i>)
FPA6L	<i>Flat Panel Airlift</i> Reaktor 6 Liter
GC/MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
hER	humaner Estrogenrezeptor
HRE	<i>hormon responsive element</i>
lacZ	Reportergen für β -Galaktosidase
n.b.	nicht bestimmt
NK	Negativkontrolle
OD	Optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenol-Galaktopyranosid
PAK	polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen
PAM	Puls-Amplituden-Modulation-Fluorometrie.
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PF	Papierfabrik
rfu	<i>relative fluorescence units</i>
PK	Positivkontrolle
PMV	Fachgebiet Papierfabrikation und Mechanische Verfahrenstechnik
R-YEA	<i>Recombinant-Yeast Estrogen Assay</i>
SAG	Stammsammlung für Algenkulturen der Universität Göttingen
scCO ₂	superkritische CO ₂ -Extraktion
TIC	Total Ionen Chromatogramm

1 Wissenschaftlich-technische und wirtschaftliche Problemstellung

1.1 Ausgangssituation

Die Bundesrepublik verfolgt das Ziel, bis zum Jahr 2050 weitgehend klimaneutral zu sein. Zur Minderung der Treibhausgas-Emissionen kann die Verwendung von Biokraftstoffen und Kunststoffen aus nachwachsenden Rohstoffen einen wesentlichen Beitrag leisten. Algenbasierte Biotreibstoffe und Kunststoffe stehen nicht mit der Nahrungsmittelproduktion in Konkurrenz, da die Zucht von Algen auf Flächen stattfinden kann, die für die Landwirtschaft nicht geeignet sind. Die Gewinnung von Algenölen (Lipiden) dient als Grundlage für die Weiterverarbeitung zu Biokraft- und Kunststoffen. Zur Gewinnung der Algenöle muss die Algenbiomasse zunächst aus der Nährlösung geerntet und anschließend für eine Extrahierung der Inhaltsstoffe getrocknet werden. Für Ernte, Trocknung und Ölextraktion können verschiedene Verfahren eingesetzt werden, einige befinden sich noch in der Entwicklungsphase. Die Nutzung von Abwässern als Nährmedien für die Algenzucht ist hochinteressant. Die sich hier ergebenden Synergien zwischen Nährstoffbereitstellung und Abwasserreinigung könnten ein aussichtsreicher Weg für eine langfristige Kostensenkung der Algenkraftstoff- bzw. Kunststoffproduktion sein. In der komplexen und vielgliedrigen Prozesskette von der Algenproduktion bis zur Produktion der algenbasierten Produkte ergeben sich allerdings noch zahlreiche Forschungsfragen, für deren Beantwortung vor allem praktische Versuchs- und Pilotanlagen sinnvoll erscheinen (Schröter-Schlaack et al., 2019). In diesem Projekt ist sowohl eine Selektion von Algenstämmen für die Lipidgewinnung als auch für die Abwasserreinigung am Beispiel der Papierfabriksabwässer vorgesehen, sowie methodische Optimierungen der Wachstumsbedingungen, Expositionszeiten und Nährstoffmangel-Bedingungen im Hinblick auf die Lipidbildung und Klärwirkung der Algen.

1.2 Stand der Forschung und Entwicklung

1.2.1 Algen-Kulturen zur Abwasserreinigung

Anhand ihrer Größe können Algen in zwei Gruppen eingeteilt werden. Als Mikroalgen werden mikroskopisch kleine Arten zusammengefasst, zu denen insbesondere einzellige Formen gezählt werden. Die Makroalgen (Großalgen) sind dagegen mit bloßem Auge erkennbar, ihre Länge reicht von wenigen Millimetern bis zu 60 Metern. Die meisten Großalgen leben im Meer (Seetang).

Einige Mikroalgen-Stämme können zur Entfernung auf Schadstoffen in Abwässern eingesetzt werden. Die Schadstoffe akkumulieren in den Mikroalgen und werden dann enzymatisch abgebaut (Gupta, Bux, 2019, Yang et al., 2002). Im Gegensatz zur herkömmlichen mikrobiellen Abwasserbehandlung wäre diese Technologie aus mehreren Gründen vorteilhaft:

- Die produzierte (Algen)-Biomasse kann für weitere Anwendungen verwendet werden
- Es fallen keine Schlämme an, die entsorgt werden müssen
- Algen können auch unter sehr schwierigen Umweltbedingungen wachsen
- Es werden keine zusätzlichen Schadstoffe in die Umwelt abgegeben
- Die minimalen Wachstumsanforderungen machen den Einsatz auch ökonomisch attraktiv (Gupta, Bux, 2019)

Zu den Stoffen, die von Mikroalgen entfernt bzw. biodegradiert werden können, gehören grundsätzlich Schwermetalle und organische Verbindungen. Erfolgreich getestet wurden polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAKs), Phenole, polychlorierte Biphenyle (PCBs) und auch endokrin wirksame Substanzen (EDCs). Aromatische Ringverbindungen können von Mikroalgen aufgebrochen werden. Die Verbindungen werden oft zunächst zu Phenol abgebaut und anschließend zum energiereichen Pyruvat metabolisiert (Gupta, Bux, 2019). Bekannt ist außerdem, dass Algen, die in der Natur bereits in einer verschmutzten Umgebung wachsen, generell toleranter und resistenter gegenüber toxischen Einflüssen sind (Pinto et al., 2002).

Aufgrund der positiven Eigenschaften sollte der Einsatz von Mikroalgen zur Entfernung von Schadstoffen gegenüber anderen Methoden präferiert werden. Für die großtechnische Umsetzung dieser Methode besteht allerdings noch weiterer Handlungs- und Forschungsbedarf (Singh et al., 2019).

1.2.2 Betrieb der Algen-Reaktoren

Traditionell werden Mikroalgen im Freien mit sogenannten „open pond“-Systemen kultiviert. Hierbei handelte es sich im Prinzip um natürliche Seen oder Teiche mit wenig Eingriff durch den Menschen bei der Kultivierung. Im Laufe der Zeit entwickelten sich unterschiedliche open pond-Systeme, nämlich „ungerührte“-Ponds, „Raceway“-„Circular“-Ponds (s. Abb. 1).

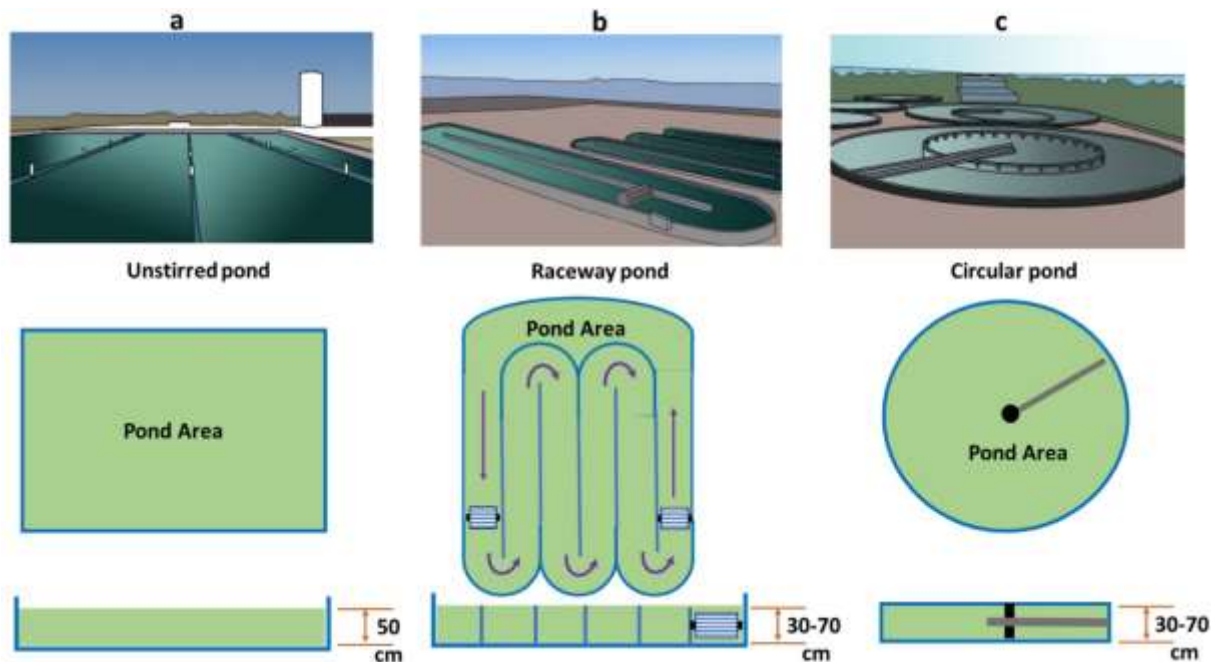


Abb. 1: Die drei unterschiedlichen "open ponds"-Systeme (Abdur Razzak et al., 2023).

„Raceway“-Ponds werden ausgeformt, um die Flächenkonkurrenz zur Nahrungsmittelproduktion zu vermeiden. Dieses System ist zwar kostengünstig, aber mit begrenzter Kontrolle, geringer Biomasseproduktion und hohem Kontaminationsrisiko verbunden. Das System ist sehr stark durch das Wetter und das Klima beeinflusst und der Betrieb eignet sich deshalb nur an entsprechenden Standorten. In den letzten Jahren wurde die Kultivierung der Mikroalgen für Forschungs- und Produktionszwecke weiterentwickelt.

Als photoautotrophe Lebensform sind Mikroalgen vom Licht abhängig, um ihre eigene Biomasse aufzubauen. Dafür werden lichtdurchlässige Bioreaktoren als Anlagen zur Mikroalgenproduktion benötigt und dementsprechend Photobioreaktoren genannt. Es gibt verschiedene Typen von Photobioreaktoren, von kleinen Reagenzgläsern bis zur

modularen Produktionsanlage. In erster Linie sind Rohrreaktoren weitverbreitet. Dabei werden Glas- oder Kunststoffrohre in horizontaler oder vertikaler Ausrichtung aufgebaut, meist in schlaufenartig angeordneten Glasröhren (s. Abb. 2a), um Fassungsvermögen und Lichtverteilung zu verbessern. Andere günstige Reaktoren sind Folien-Photobioreaktoren, die aus aufgehängten PVC- oder PE-Folien aufgebaut werden (s. Abb. 2b). Die Firma Evergreen-Food GmbH benutzt beispielsweise lebensmittelechte 3-Schicht-System-Folien-Photobioreaktoren in V-Modulen (Vertikalsystem) zur Algenvermehrung, wobei ein Modul aus 144 dieser V-Schläuche aufgebaut ist. Daneben werden auch Flachbettreaktoren aus Kunststoff oder Glasplatten hergestellt. Wie Rohrreaktoren sind die Platten vertikal oder horizontal so angeordnet, dass zwischen ihnen eine dünne Schicht von Algensuspension eine gute Lichtversorgung bietet (s. Abb. 2c).

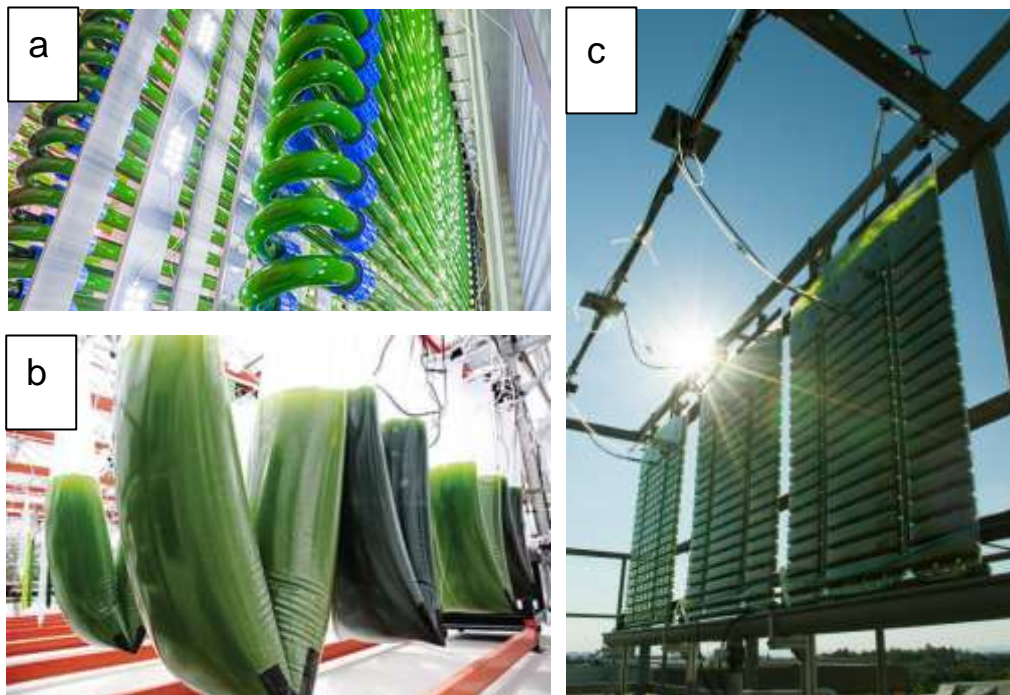


Abb. 2: Photobioreaktor-Typen. a. Glasrohr- (Schott, 2024), b. Folien- (Koller, 2015), c. Flachbettreaktor (Fraunhofer IGB, 2024).

1.2.3 Charakterisierung der Papierfabrikabwässer und Anforderung an die Beschaffenheit

Die mittlere spezifische Abwassermenge bei der Papierherstellung liegt nach Angaben des Verbandes Die Papierindustrie e.V. bei 8,7 l/kg Papier (Weßel et al., 2022). Da überwiegend Holz- und Altpapierstoffe als Faserstoff für die Papiererzeugung verwendet werden, enthalten die Papierfabrikabwässer eine hohe Fracht an organischen Substanzen (Möbius C.-H., 2017). Die biologische Reinigung mit konventionellen aeroben und kombinierten aerob-anaeroben Abwasserreinigungsprozessen, ggf. ergänzt durch weitere mechanische und/oder chemische Prozesse, ist Stand der Technik in der Behandlung von Prozesswässern der Papierherstellung. Trotz der Vorteile der biologischen Abwasserreinigung (durch alleinige bakterielle Aktivität) kann die Entfernung einiger Stoffe, wie endokrin wirksamer Verbindungen (EDCs), refraktärer, schwer abbaubarer organischer Stoffe wie Huminstoffe und huminstoffähnliche Stoffe, nicht vollständig gewährleistet werden (Balabanic, Krivograd Klemencic, 2011, Lazer L., 2017). Eine genaue qualitative und quantitative Bestimmung von einzelnen Inhaltsstoffen von Abwässern ist aufgrund der Vielfalt der enthaltenen Substanzen praktisch kaum möglich. Als Summenparameter hat sich daher zur Analyse und Beurteilung des Abwassers der Chemische Sauerstoffbedarf (CSB) als Leitparameter für organische Wasserinhaltsstoffe etabliert. Als Einflussgrößen auf den CSB-Wert des Papierfabrikabwassers können verwendeter Rohstoff, chemische Additive, spezifische Abwassermenge und interne Wasserreinigungs- und -rückführungssysteme genannt werden (Pinnekamp, 2007). Der CSB im gereinigten Abwasser ist abhängig vom Gehalt des unbehandelten Abwassers an schwer abbaubaren Stoffen. Übliche Werte liegen im Bereich zwischen 80 und 500 mg/l CSB in Abhängigkeit von der hergestellten Papiersorte (DWA, 2006). Die angewendeten Farbstoffe und anderen chemischen Additive, aber auch die natürlich im Holz enthaltenen Halogenverbindungen verursachen die Entstehung von adsorbierbaren organischen Halogenverbindungen (AOX) im Abwasser. Die spezifische AOX-Fracht in holzhaltigen Papieren liegt zwischen 0,9 und 5,4 g/t und in altpapierhaltigen Papieren zwischen 0,9 und 7,5 g/t. Stickstoff- und Phosphorgehalte in Papierabwässern stammen im Wesentlichen aus Nährstoffen, die zur biologischen Behandlung der Abwässer verwendet werden. Außerdem können Additive und Frischwasser die Erhöhung der Konzentration an Stickstoff und Phosphor

verursachen. Es ist dabei eine spezifische P-Fracht von 0,01 bis 0,04 kg/t und eine spezifische Fracht von $N_{\text{anorganisch}}$ von 0,01 bis 0,8 kg/t im Ablauf der Nachkläranlage zu erwarten (Möbius C.-H., 2017). Schwermetall-Konzentrationen sind in Papierabwässern normalerweise vernachlässigbar gering und um Größenordnungen geringer als die Schwellenwerte des Abwasserabgabengesetzes. Eine deutliche Erhöhung dieser Konzentration durch Altpapiereinsatz wird nicht beobachtet. Bei der Erzeugung von Holzstoffen können bestimmte Metalle, die im Holz in höheren Konzentrationen auftreten (z. B. Eisen, Kupfer, Mangan), zu leicht erhöhten Konzentrationen im Abwasser beitragen (Möbius C.-H., 2017). In den Abwässern von Papierfabriken können EDCs enthalten sein. Einige dieser hormonähnlichen Stoffe, die bei Mensch und Umwelt verschiedene unerwünschte Wirkungen auslösen können, werden in geringen Mengen für die Papierherstellung und -verarbeitung verwendet oder kommen als Verunreinigungen in anderen Chemikalien vor (Kersten, 2009b). Zu diesen Stoffen gehören neben den aus dem Holz stammenden natürlichen Lignanen und phenolischen Verbindungen unter anderem Vertreter der Phthalate, Bisphenole und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK) (Hamm et al., 2008). Bereits erfolgte Untersuchungen innerhalb der Forschungsprojekte INFOR-Projekt Nr. 70 und AiF-Projekt Nr. 15181 N zur Untersuchung endokrin wirksamer Substanzen in Papierabwässern zeigen, dass in biologisch gereinigten Abwässern der Papierindustrie mit endokrinen Wirkungen zu rechnen ist (Kersten, 2009b, Umweltbundesamt, 2016). In der Wasserrahmenrichtlinie (WRRL) sind endokrine Stoffe im Anhang X als prioritäre Stoffe klassifiziert (EU, 2008). Die Europäische Union hat sich bereits in der Community Strategy for Endocrine Disruptors (COM (1999) 706 final) das Ziel gesetzt, regulatorische Maßnahmen zum Schutz vor endokrinen Disruptoren zu schaffen und setzt derzeit mit ihren gesetzlichen Rahmenbedingungen weltweit Maßstäbe (EU, 1999).

1.2.4 Mikroalgen zur Abwasserreinigung in der Papierindustrie

In den letzten Jahren wurden bereits mehrere Untersuchungen zur Eignung von Mikroalgen zur Abwasserreinigung in der Papierindustrie durchgeführt. Laut diesen Studien für Abwasser aus Altpapier verarbeitenden Papierfabriken ist der Abbau von BSB bis zu 82 % und CSB bis zu 75 % durch eine Mischkultur von Mikroalgen innerhalb von 28 Tagen möglich (Usha et al., 2016). Außerdem wurde eine Entfernung

von 65 % des Nitrats und 71% des Phosphats beobachtet. Algen konnten weiterhin bis zu 84 % der Farbe und 80 % der AOX-Fracht aus ausgewählten Abwässern der Zellstoff- und Papierindustrie entfernen (Tarlan et al., 2002). In Deutschland wurden 2013 bis 2014 Algen-Bakterien-Kulturen (ALBA) zur Optimierung des Abwasserreinigungsprozesses in der Papierindustrie durch die Papiertechnische Stiftung (PTS) untersucht (Weinberger et al., 2015). Neben der Reinigung von Papierabwässern in Altpapier verarbeitenden Papierfabriken lag der Fokus auf der Produktion von Biomasse zur Biogasproduktion. Dabei wurde der benötigte Sauerstoff für die Mikroorganismen im Reinigungsprozess, welcher standardmäßig mit Belüftungssystemen eingebracht werden muss, durch Mikroalgen als Sauerstoffproduzent bereitgestellt. Auf diese Weise wurde der Energieaufwand deutlich reduziert und eine bessere Abbauleistung erreicht. Dieses System hat eine ca. 84 % CSB-Abbauleistung in einem Zeitraum von ca. 8 Tagen gezeigt, eine stabile Abbauleistung von Stickstoff und Phosphor wurde nicht festgestellt. Die bislang durchgeführten Untersuchungen bilden damit die Grundlage für eine Weiterentwicklung des Verfahrens zur Abwasserreinigung mit Mikroalgen. Die Fähigkeit der Mikroalgen zur Entfernung der EDCs in Papierfabrikabwässern fand in den bisherigen Arbeiten noch keine Berücksichtigung. Außerdem wurde die Charakterisierung nur an einem offenen Reaktor durchgeführt, der keine stabilen Versuchsbedingungen gewährleisten konnte und in dem durch Kontamination die Effektivität des Systems deutlich reduziert war.

1.2.5 Toxikologische Untersuchungen zur Charakterisierung des Abwassers

Grundsätzlich kann Abwasser auf viele toxikologische Endpunkte hin untersucht werden. Für den Nachweis östrogenen Wirkungen wurden unter Beteiligung des Antragstellers zwei Methoden in dem durch das BMBF-geförderten Projekt „Gefährdungsbasiertes Risikomanagement für anthropogene Spurenstoffe zur Sicherung der Trinkwasserversorgung (Tox Box)“ überprüft und als besonders geeignet bewertet: Der ER-CALUX-Test, ein Reporter-Gen-Test mit Säugerzellen und der R-YEA-Test, ein Reporter-Gen-Test mit Hefezellen (Grummt et al., 2018). Beide Tests waren gut reproduzierbar und sensitiv im Nachweis von östrogenen Wirkungen (Kuckelkorn et al., 2018). Der CALUX-Test hat jedoch zwei Nachteile, zum einen müssen die Abwasserproben sterilfiltriert werden und zum anderen muss für diesen

Test jährlich eine Lizenz erworben werden, die erhebliche Kosten verursacht. In diesem Projekt soll daher mit dem R-YEA gearbeitet werden. Toxikologische Untersuchungen sind zur Beurteilung des Klärpotenzials der Algen wichtig, da nicht alle östrogen wirkenden Stoffe in den Abwässern bekannt sind. Weiterhin sollte erfasst werden, ob östrogene Problemstoffe über Metabolisierung durch die Algen auch tatsächlich inaktiviert werden oder ob östrogen-wirkende Metabolite entstehen.

Das Testsystem R-YEA nutzt Zellen der Bäckerhefe, *Sacharomyces cerevisiae*, die derart gentechnisch verändert wurden, dass sie einen menschlichen Östrogenrezeptor (ER) bilden können, der aktiviert durch einen Agonisten, die Transkription eines Antwortgenes (Dotterstoff Vitellogenin) bewirkt. An die regulatorischen Sequenzen dieses Vitellogeningens wurde ein sog. Reporter gen, die β -Galaktosidase, gebunden. Dringen östrogene Stoffe in die Zelle ein, so binden sie an den Östrogenrezeptor und aktivieren seine Funktion als Transkriptionsfaktor. Der aktivierte ER wandert in den Zellkern, bindet an die regulatorische Sequenz des Vitellogeningenes und bewirkt so die Transkription der β -Galaktosidase. Die β -Galaktosidase spaltet das farblose Substrat o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG) in Galaktose und den gelben Farbstoff Nitrophenol. Die Aktivierung des Östrogenrezeptors kann somit photometrisch mittels eines Enzymtests bestimmt werden (Coldham et al., 1997).

1.2.6 Produktion von Lipiden und Biobrennstoffen aus Algen

Mikroalgen spielen eine bedeutende Rolle für das Leben insgesamt. Nicht nur, dass sie bis zu 50 % des atmosphärischen Sauerstoffs durch Umwandlung von Kohlendioxid mittels Sonnenlichtes als Energiequelle produzieren, sondern sie bilden auch wertvolle Inhaltsstoffe wie Antioxidantien und mehrfach ungesättigte Fettsäuren (Posten, 2012). Untersuchungen zur biochemischen Zusammensetzung von Algen-Lipiden, Kohlenhydraten, Proteinen und Pigmenten werden schon lange überall auf der Welt durchgeführt und es gibt einige Algenarten, die als Nahrungsergänzungsmittel verwendet werden (Solovchenko et al., 2011, van Wageningen et al., 2012, Volkman et al., 1993). In Abhängigkeit von der Spezies beträgt der Lipidgehalt bis zu 77 % der Trockenmasse (Chisti, 2007, Prastija, 2019), weshalb es mittlerweile viele Projekte zur Herstellung von alternativem Biotreibstoff aus Algenöl gibt (Campos et al., 2014, Chen et al., 2015). Zurzeit wird der kommerzielle Biodiesel aus pflanzlichem Öl, aus Mais, Sojabohnen, Raps und Palmöl hergestellt. Hierbei

handelt es sich um Kulturen, deren Anbau auf landwirtschaftlichen Nutzflächen stattfindet, welche in Konkurrenz zur Nahrungsmittelproduktion stehen. Auf die Kultur von Mikroalgen trifft dies nicht zu. Im Vergleich zu anderen Biodieselquellen haben Mikroalgen zudem eine höhere Ölproduktivität (Hadiyanto et al., 2012). Der Lipidgehalt der Mikroalgenart *Nannochloropsis (Microchloropsis) salina* kann zwischen 31 – 68 % der Trockenmasse betragen, knapp 60 % davon sind die Palmitinsäure (C16:0) und die Palmitoleinsäure (C16:1), welche zur Biotreibstoffproduktion geeignet sind (Chen et al., 2015, Chisti, 2007). In einer Bachelorarbeit der HDA wurde ein Lipidgehalt von 67,2 % erreicht, davon ca. 75 % Palmitinsäure und Palmitoleinsäure (Prastija, 2019). Als vielversprechend sind auch *Chlorella* spp. und *Schizochytrium* spp. anzusehen, die Lipidgehalte von bis zu 58 oder 77 % erreichen (Akubude et al., 2019). Diese hohen Werte werden unter Bedingungen des Stickstoff- und/oder Phosphatmangels erreicht, wie auch im Labor der HDA bestätigt wurde (Prastija, 2019).

2 Forschungsziel und Lösungsweg

2.1 Forschungsziel

In diesem Projekt soll gezeigt werden, dass gereinigte Abwässer der Papierherstellung prinzipiell als Basis für Nährmedien zum Wachstum von Mikroalgen geeignet sind. Die Arbeitshypothese, dass durch den Stoffwechsel der Mikroalgen der Rest-CSB im Abwasser und das endokrine Potential gesenkt werden können, soll bestätigt werden. Ziel ist es, aus den Mikroalgen, die in den Papierfabriksabwässern kultiviert werden, Algenöle in Konzentrationen von 40 bis 70 % der Trockenmasse zu extrahieren und die chemische Zusammensetzung der Algenöle in Bezug auf ihre Eignung zur Produktion von Biotreibstoffen und Biokunststoffen zu charakterisieren. Auf Basis der Untersuchungsergebnisse soll die Möglichkeit einer wirtschaftlichen Umsetzung einer derartigen Abwasserreinigungstechnologie in der Papierherstellung bewertet werden.

Zur Bearbeitung dieses Themas sollen schrittweise, beginnend mit Screening-Untersuchungen mit kleinen Abwasservolumina, geeignete Mikroalgenspezies gefunden werden, die unter Variation verschiedener Einflussfaktoren in der Matrix Papierfabriksabwasser geeignete Wachstumsbedingungen finden. Dazu sind verschiedene Papierfabriksabwässer auf ihre chemische Zusammensetzung zu untersuchen und die Parameter zu identifizieren, die das Wachstum der Mikroalgen

unterstützen. Nach Optimierung der Wachstumsbedingungen im Labormaßstab werden die Untersuchungen über zwei Schritte (Reaktorvolumina von 6 bzw. 28 L) in den Technikumsmaßstab hochskaliert. Parallele Untersuchungen zur Bewertung der Detoxifikation des Abwassers (Reduktion von endokrin wirksamen Substanzen) begleiten die Versuche im Labor- und Technikumsmaßstab.

2.2 Lösungsweg zur Erreichung des Forschungsziels

2.2.1 Arbeitspaket 1: Recherche, Auswahl und Beschaffung geeigneter Mikroalgenspezies

In AP 1 wird eine Literaturrecherche zur Auswahl geeigneter Mikroalgenspezies durchgeführt. Hauptkriterien sind dabei 1) einfache Kultivierung, 2) guter Fremdstoffmetabolismus und 3) Fähigkeit zur Lipidbildung. Drei bis fünf Spezies sollen nach der Recherche beschafft werden und in ersten praktischen Versuchen hinsichtlich ihres Anwendungspotenzials untersucht werden. Dazu gehört die Wachstumsgeschwindigkeit und die Einschätzung der Lipidbildung. Die Algenanzucht wird in einem speziell zu diesem Zweck angeschafften Reaktorsystem der Fa. CellDeg stattfinden. Falls notwendig, sollen die Anzuchtbedingungen zur Vorbereitung auf die Versuche in den nächsten Arbeitspaketen angepasst und optimiert werden. Für die Anregung der Lipidbildung soll in Anlehnung an Literaturbefunde eine Kultivierung unter definierten Stressbedingungen, z. B. Nitratmangel, getestet werden.

2.2.2 Arbeitspaket 2: Auswahl und Voruntersuchung geeigneter Papierfabriksabwässer

In AP 2 ist die Auswahl eines geeigneten Papierfabriksabwassers für die Algenkultivierung vorgesehen. Dazu werden die Abwasserreinigungsanlagen von mehreren Papierfabriken beprobt, die sich hinsichtlich ihres Produktionsspektrums, des Faserstoffeintrags und der Abwasserreinigungstechnik unterscheiden. Zusätzlich sollen auch die verschiedenen Stufen einer Abwasserreinigungsanlage in die Untersuchungen mitaufgenommen werden.

Die Proben werden auf allgemeine Abwasserparameter wie CSB, AOX, Phosphor und Stickstoff getestet. Ergänzend wird überprüft, ob Rückstände von endokrin wirksamen Substanzen vorliegen. Dieser Nachweis erfolgt über einen Biotest mit rekombinanten Hefestämmen (*recombinant yeast estrogen assay*, R-YEA). Für die Wachstumsuntersuchungen wird das Abwasser mit Mikroalgenkulturen inokuliert und

die Biomassebildung mit Kulturen in Kontrollmedium verglichen. Die Anzucht findet unter den angepassten Bedingungen von AP 1 statt.

Nach Abschluss von AP 2 soll eine Papierfabrik, bei der gleichzeitig ein hoher Bedarf an zusätzlicher Reinigung vorliegt und die ein gutes Algenwachstum gewährleistet, für die nachfolgenden Untersuchungen ausgewählt werden.

2.2.3 Arbeitspaket 3: Untersuchungen zum Wachstum von Mikroalgen in verschiedenen Papierfabriksabwässern und Optimierung der Versuchsdurchführung im Labormaßstab

Zur weiterführenden Untersuchung des Algenwachstums werden in AP 3 aus der gewählten Papierfabrik in regelmäßigen Abständen weitere Proben entnommen. Zunächst sollen mehrere Versuche zur Optimierung der Versuchsdurchführung erfolgen. Die Parameter Lichtintensität, CO₂-Begasung sowie Abwasseranteil werden entsprechend variiert und die jeweils günstigsten Bedingungen ermittelt.

Anschließend wird ein zweistufiger Kultivierungsprozess erarbeitet. In Phase 1 ist die Biomassebildung vorgesehen. Hier sollen die Algen unter optimalen Bedingungen im Abwasser wachsen, gleichzeitig findet die geplante Detoxifizierung statt. Anschließend wird über eine Änderung der Kultivierungsbedingungen die Produktionsphase eingeleitet. Die aus AP 1 gewonnenen Erkenntnisse zur Lipidbildung unter definierten Stressbedingungen sollen hier zur Anwendung kommen.

Zur Bewertung des Algenwachstums wird die OD, die Zellzahl und die Trockenmasse bestimmt. Die Photosynthese-Leistung wird über Chlorophyll-Fluoreszenz und PAM-Fluorometrie bewertet. In der Produktionsphase wird der Lipidgehalt mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Nilrot eingeschätzt.

In Vorbereitung auf die Übertragung in den Technikumsmaßstab sollen die Versuche bei den eingestellten Kultivierungsbedingungen standardisiert werden.

2.2.4 Arbeitspaket 4: Untersuchung des Wachstums der Mikroalgen im Labormaßstab und Bewertung der Clearance-Kapazität

Im Fokus des vierten Arbeitspaketes stehen die Untersuchungen der Clearance-Kapazität der ausgewählten Mikroalgen. Die Mikroalgen werden in Modellabwasser mit östrogen wirkenden Problemstoffen (Bisphenol A und Nonylphenol) kultiviert und nach verschiedenen Zeitpunkten die östrogene Wirkung des Gemischs mittels Hefetest (R-YEA) untersucht. Erwartungsgemäß soll diese kontinuierlich über den

Algenstoffwechsel gesenkt werden. Die Erfassung der Wirkung ist wichtig, da mittels chemischer Analytik nicht erfasst wird, ob bei der Verstoffwechslung dieser Problemstoffe nicht Metabolite mit ebenfalls östrogenen Wirkung entstehen und somit eine Clearance nicht gegeben wäre.

Um auszuschließen, dass Einflussfaktoren in der Abwassermatrix die Clearance-Kapazität beeinflussen, werden die Versuche mit realen Abwasserproben wiederholt. Diese Versuche sollen auf den Algenstamm beschränkt werden, mit dem zuvor die maximale Clearance im Modellabwasser erzielt wurde. Das Abwasser wird dazu mit gleichen Konzentrationen an Problemstoffen gespickt und zusätzlich zur östrogenen Wirkung wird hier auch die Konzentrationen der Stoffe mittels chemischer Analytik (GC/MS) ermittelt.

Für den Nachweis endokrin wirksamer Substanzen in nativen Abwasserproben ist aufgrund der nur in Spuren vorliegenden Konzentrationen ein größeres Flüssigkeitsvolumen erforderlich. Die Untersuchungen dazu finden aus diesem Grund im Technikumsmaßstab (AP 5) statt.

Neben der Clearance-Kapazität der Mikroalgen sind in AP 4 erste Untersuchungen zum Zellaufschluss vorgesehen. Dies ist notwendig, um im späteren Verlauf Zellinhaltsstoffe wie die Lipide aus den Zellen zu extrahieren. Geplant ist, einen mechanischen Aufschluss mittels Schwingmühle und Hochdruckhomogenisator zu testen. Für die Versuche im Technikumsmaßstab, bei denen größere Zellmassen anfallen werden, sollen in AP 6 Untersuchungen zur Extraktion mittels überkritischem CO₂ erfolgen.

2.2.5 Arbeitspaket 5: Untersuchung des Wachstums im Technikumsmaßstab und Bewertung der Clearance-Kapazität

In AP 5 erfolgt die Hochskalierung der Versuche in den Technikumsmaßstab. Dazu stehen an der Hochschule zwei 6-Liter-Flachbettreaktoren der Fa. Subitec zur Verfügung. Eingesetzt werden nur noch die Mikroalgenpezies, die sich in den vorangehenden Arbeitspaketen als besonders effizient hinsichtlich der Parameter Wachstum, Lipidproduktion und Klärwirkung erwiesen haben.

Die Ergebnisse der Versuche im Labor- und Technikumsmaßstab werden verglichen, dabei liegt der Fokus auf dem Algenwachstum sowie der Lipidbildung. Wie in AP 3 werden die Algen in zwei Phasen (Wachstums- und Produktionsphase) kultiviert. Nach

der Wachstumsphase wird die Reduktion endokrin wirksamer Substanzen aus dem nativen Abwasser zusätzlich zum Hefetest (R-YEA) mittels Spurenstoffanalytik (GC/MS) untersucht. Falls eine Anpassung der Versuchsbedingungen in Hinblick auf eine gute Klärwirkung erforderlich ist, soll diese Anpassung erarbeitet werden.

2.2.6 Arbeitspaket 6: Produktion von Lipiden aus Mikroalgen

In AP 6 ist die Gewinnung und Untersuchung der Mikroalgen-Lipide vorgesehen. Die Algen-Biomasse wird durch Abtrennung der Fest- von der Flüssigphase isoliert, gefriergetrocknet und die Lipide durch Lipidextraktion gewonnen. Die Lipidfraktionen werden quantitativ und qualitativ untersucht. Die Lipidmenge soll gravimetrisch bestimmt werden, die Zusammensetzung der Fettsäuren kann nach Umesterung zu Fettsäuremethylestern über Gaschromatographie analysiert werden. Ziel ist ein möglichst hoher Anteil an C14-20-Lipiden, um eine gute Basis für die Weiteraufarbeitung zu hochwertigen Materialien wie Kunststoffen zu generieren.

Das Arbeitspaket dient auch der weiteren Optimierung der Lipidproduktion im Technikumsmaßstab unter qualitativen Aspekten. Es erfolgen Anpassungen bzgl. der Stressbedingungen, die für eine Produktion von besonders gut verwertbaren Lipiden optimal sind. Hier sollen Faktoren wie Beleuchtung, Dauer der Phase und Art und Konzentration der Stressfaktoren wie Stickstoff- oder Phosphatmangel variiert und der Einfluss dieser Parameter auf die qualitative Ausbeute von Lipiden beurteilt werden.

Die Lipidextraktion wird anhand zwei verschiedener Methoden untersucht. Zuerst wird die Lipidextraktion über eine Soxhlet-Apparatur durchgeführt. Bei dieser Methode ist die Auswahl der geeigneten Lösungsmittel der entscheidende Faktor. Die polaren Lösungsmittel extrahieren den polaren Anteil der Lipide, wohingegen die unpolaren Lösungsmittel den neutralen Teil der Lipide extrahieren können. Eine Mischung aus polaren und unpolaren Lösungsmitteln kann sowohl neutrale Lipide als auch polare Lipide extrahieren. Um den Einfluss des Lösungsmittels auf die gewonnenen Lipide zu untersuchen, wird dieses Verfahren zum einen mit unpolaren Reinstoffen als Lösungsmittel (z. B. n-Heptan und n-Hexan) und zum anderen mit Kombinationen aus polaren und unpolaren (z. B. n-Hexan/Isopropanol) Lösungsmitteln durchgeführt. Dabei wird die eingesetzte Lösungsmittelmenge und die Extraktionsdauer in Korrelation zur erzielten Lipidkonzentration gesetzt.

Weiterhin wird die überkritische CO₂-Lipidextraktion (scCO₂) untersucht. Dazu ist am PMV eine Hochdruckanlage zur überkritischen CO₂-Extraktion und entsprechende Expertise aus früheren AiF-Projekten vorhanden (AiF 17756 und 19148). In Abbildung 5 ist das Verfahrensfließbild der Anlage dargestellt. Die Effektivität der Lipidextraktion mit überkritischem CO₂ ist stark von den Versuchsparametern, wie z. B. Druck, Temperatur und Zeit, abhängig. Diese sollen im Rahmen des Prozesses untersucht und optimiert werden.

2.2.7 Arbeitspaket 7: Up-Scaling, Vergleich der Testergebnisse im Labor- und Technikumsmaßstab und Kostenabschätzung

In diesem Arbeitspaket erfolgt ein weiteres Up-Scaling zu 28-L-Reaktoren. Die HDA verfügt über vier Flachbettreaktoren der Fa. Subitec mit einem Kulturvolumen von 28 L. Diese entsprechen technisch den FPA6L, die in den AP 5 und 6 zum Einsatz kamen: Die Algenkulturen der beiden FPA6L Reaktoren dienen als Vorkultur für das Animpfen der 28-L-Reaktoren.

Unter Berücksichtigung aller bis dahin erzielten Ergebnisse werden die Algen nun in großen Volumina angezogen und Wachstum, Klärwirkung sowie Lipidproduktion beurteilt. Mit diesen großen Volumina wird auch eine Anpassung der Methoden, wie dem Zellaufschluss, der Abtrennung der Algen aus der Flüssigphase sowie der Biomassetrocknung erforderlich. In diesem Zusammenhang wird beispielsweise der Einsatz eines Tellerseparators und ggf. die Trocknung der Biomasse über eine vorhandene Anlage im Technikumsmaßstab erprobt.

Es werden erhobene Ergebnisse im Labor und Technikumsmaßstab verglichen, um die Fähigkeit des Algen-Systems zur Entfernung von Stickstoff, Phosphor, Schwermetallen sowie EDCs aus Abwasser der Papierindustrie zu untersuchen. Außerdem wird eine Kostenabschätzung zum System-Energieaufwand und dem erzielbaren Gewinn durch Produktion von Wertstoffen durchgeführt. Anschließend werden die Abbauleistung des Algen-Systems und die mögliche Produktion von Wertstoffen pro Abwassermenge modelliert, um eine genaue Kostenabschätzung für eine zukünftige Versuchsdurchführung in Papierfabriken zu ergeben.

2.2.8 Arbeitspaket 8: Dokumentation und Berichterstattung

Die in den Arbeitspaketen 1 bis 7 erarbeiteten technischen Lösungen, die erhobenen Daten und die daraus abgeleiteten Schlussfolgerungen werden in Zwischenberichten und im Abschlussbericht nachvollziehbar dokumentiert. In den regelmäßig stattfindenden Sitzungen des projektbegleitenden Ausschusses werden die Zwischenergebnisse präsentiert und die weitere Vorgehensweise abgesprochen. Die im Plan zum Ergebnistransfer beschriebenen Maßnahmen werden vorbereitet und umgesetzt.

2.3 Personaleinsatz, Geräte und Leistungen Dritter

2.3.1 FE 1: TU Darmstadt, PMV

Die Planung, Betreuung und Auswertung der Forschungsarbeiten erfolgte durch wissenschaftliche Mitarbeiter. Die Laboranten wurden für die Versuchsdurchführung im Labor sowie die messtechnische Erfassung der Verfahrens- und Prüfparameter eingesetzt. Zur Unterstützung des umfangreichen Versuchsplans kamen studentische Hilfskräfte zum Einsatz.

Die geleistete Arbeit des wissenschaftlich-technischen Personals (A.1, HPA A) von insgesamt 20,88 Personenmonaten über die gesamte Laufzeit des Vorhabens entsprechen den beantragten Mitteln und waren für die Durchführung des Vorhabens notwendig und angemessen. Gleiches gilt für die geleistete Arbeit des übrigen Fachpersonals und der studentischen Hilfskräfte.

Die Beschaffung von Geräten und die Vergabe von Leistungen an Dritte waren nicht vorgesehen und wurden auch nicht durchgeführt.

2.3.2 FE 2: Hochschule Darmstadt

Zu Beginn des Projektes wurde antragsgemäß ein Algen-Reaktorsystem der Firma CellDeg, Berlin, im Wert von 43.380,00 € (brutto) beschafft, in Betrieb genommen und für Untersuchungen in den Arbeitspaketen 1 bis 4 genutzt. Die Vergabe von Aufträgen an Dritte war nicht geplant und war auch nicht erforderlich.

Die geleistete Arbeit des wissenschaftlich-technischen Personals (A.1, HPA A) von insgesamt 28,5 Personenmonaten über die gesamte Laufzeit des Vorhabens entsprechen den beantragten Mitteln und waren für die Durchführung des Vorhabens notwendig und angemessen. Gleiches gilt für die geleistete Arbeit des übrigen Fachpersonals und der studentischen Hilfskräfte.

3 Versuchsdurchführung und Ergebnisse

In den folgenden Unterkapiteln wird die Versuchsdurchführung innerhalb der einzelnen Arbeitspakete beschrieben.

3.1 Arbeitspaket 1: Recherche, Auswahl und Beschaffung geeigneter Mikroalgenspezies

Im Rahmen des ersten Arbeitspaketes wurde eine Literaturrecherche zur Auswahl geeigneter Mikroalgenspezies durchgeführt, die ausgewählten Spezies angeschafft und für die ersten Versuche in Kultur genommen.

3.1.1 Literaturrecherche

Die Literaturrecherche erfolgte nach den Kriterien 1) einfache Kultivierung, 2) guter Fremdstoffmetabolismus und 3) Fähigkeit zur Lipidbildung. Besonders zu Punkt 2) ließen sich in der Literatur ausführliche Informationen finden:

Mikroalgen sind dazu in der Lage, aromatische Ringe, wie sie in der Strukturformel von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAKs) und vielen EDCs wie 17- β -Ethinylöstradiol vorkommen, aufzubrechen. Deshalb eignen sich Mikroalgen gut zur Elimination dieser Verbindungen. Wie in Tab. 1 gezeigt, wurden sowohl eine Reihe von verschiedenen Algenstämmen als auch verschiedene Stoffklassen erfolgreich für den biologischen Abbau überprüft. Neben Pharmazeutika und persönlichen Pflegeprodukten, die hauptsächlich in kommunalem Abwasser zu erwarten sind, können auch Industriechemikalien eliminiert werden.

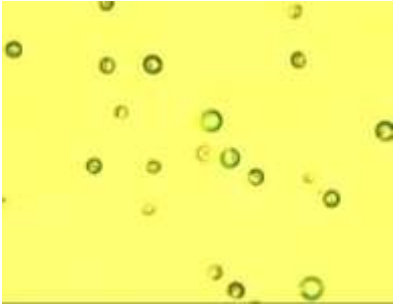
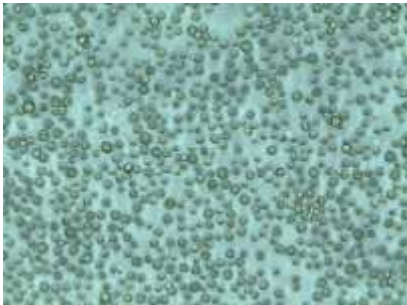
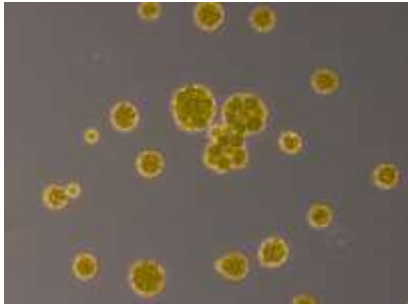

Tab. 1: Zusammenfassung der Literaturstudie zur metabolischen Kompetenz in Anlehnung an (Singh et al., 2019).

Stoffklassen-kategorie	Endokriner Disruptor	Geeignete Mikroalgen zur Reduktion von EDC's aus Abwassermatrizes	Referenz
Pharmazeutika: Hormone	17 α -Ethinylestradiol (EE2)	<i>A.Cylindrica</i> , <i>S.quadricauda</i> , <i>Chlorella spezies</i> , <i>Chlorococcus spezies</i> , <i>S.platensis</i> , <i>A.var</i> und andere	(Hom-Diaz et al., 2015, Shi et al., 2010)
	17 α -estradiol	<i>S.dimorphus</i> <i>N.incerta</i>	(Zhang et al., 2014)
	17 β -estradiol (E2)	<i>S.dimorphus</i> ; <i>A.Cylindrica</i> , <i>S.quadricauda</i> , <i>Chlorella spezies</i> ,	(Shi et al., 2010, Zhang et al., 2014)

Stoffklassen-kategorie	Endokriner Disruptor	Geeignete Mikroalgen zur Reduktion von EDC's aus Abwassermatrizes	Referenz
		<i>Chlorococcus spezie</i> , <i>S.platensis</i> , <i>A.var</i> und andere	
	Estrone	<i>S.dimorphus</i> <i>A.Cylindrica</i> , <i>S.quadricauda</i> , <i>Chlorella spezie</i> , <i>Chlorococcus spezie</i> , <i>S.platensis</i> , <i>A.var</i>	(Shi et al., 2010, Zhang et al., 2014)
	Progesterone	<i>M.terena</i>	(Safarian et al., 2012)
Persönliche Pflegeprodukte	Bisphenol A	<i>C.mexicana/oblonga</i> <i>C.vulgaris</i> <i>C.fusca</i>	(Hirooka et al., 2005, Ji et al., 2014)
	Triclosan	<i>C. pyrenoidosa</i>	(Wang et al., 2013b)
Pestizide/ Herbizide	3,4-Dichloranilin	<i>C. pyrenoidosa</i>	(Wang et al., 2013a)
	A-Endosulfan	<i>Chlorococcum sp.</i> <i>Scenedesmus sp.</i>	(Sethunathan et al., 2004)
	Diazinon	<i>C.vulgaris</i>	(Kurade et al., 2016)
Industrie-chemi-kalien	Fluoranthen und Pyren	<i>C.vulgaris</i>	(Lei et al., 2002)

Für einige dieser metabolisch kompetenten Mikroalpengattungen konnten in der Literatur auch hohe Lipidbildungsraten nachgewiesen werden. Insbesondere den Gattungen *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Chlorococcum* und *Scenedesmus* wird ein Lipidgehalt von über 50 % zugesagt (Rayati et al., 2020, Xu et al., 2018, Yeh, Chang, 2011, Zhang et al., 2018). Außerdem konnten diese Gattungen auch bereits in verschiedenen industriellen Abwässern kultiviert werden (Kumar et al., 2020, Sanusi, 2022, Tao et al., 2017, Weinberger et al., 2015). Auf Grundlage der Recherche wurden insgesamt vier Algenstämme ausgewählt und von der Stammsammlung für Algenkulturen der Universität Göttingen (SAG) bezogen (s. Tab. 2).

Tab. 2: Ausgewählte Mikroalgenstämme, die von der SAG bezogen wurden und deren Besonderheit.

Mikroalgenstamm	Besonderheiten	Referenz
<p><i>Chlamydomonas oblonga</i> SAG 11-60a</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Abbau Bisphenol A • 33 % Lipidgehalt 	<p>(Abou-Shanab et al., 2013, Ji et al., 2014)</p>
<p><i>Chlorella vulgaris</i> SAG 211-11b</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Abbau Bisphenol A • Pilotanlage in Papierfabrik (Forschungsprojekt PTS) • 56 % Lipidgehalt 	<p>(Ji et al., 2014, Weinberger et al., 2015, Yeh, Chang, 2011)</p>
<p><i>Chlorococcum oleofaciens</i> SAG 213-11</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Publikation zur Reinigung Papierfabriksabwasser • 59 % Lipidgehalt 	<p>(Rayati et al., 2020, Sanusi, 2022)</p>
<p><i>Scenedesmus acuminatus</i> SAG 38.81</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Robust, sichelförmige Zellen • Resistenz gegenüber Abwasser-Kontaminationen • 54 % Lipidgehalt 	<p>(Bioökonomie, 2022, Tao et al., 2017, Zhang et al., 2018)</p>

3.1.2 Algenanzucht

Die angeschafften Reinkulturen wurden auf Agarplatten ausgestrichen und als Dauerkulturen mit regelmäßiger Erneuerung bei Raumtemperatur im Tageslicht ohne direkte Sonneneinstrahlung gelagert. Dieses Verfahren eignet sich, um die Mikroalgenstämme kontinuierlich im Labor zu erhalten und ohne Adaptationsphase in Versuchen mit Belichtung einzusetzen. Für die Langzeitlagerung wurden die Algenstämme in 10 % (v/v) Methanol und 90 % (v/v) Medium bei -80 °C eingefroren.

Anschließend erfolgte die Inbetriebnahme des Algenreaktorsystems der Fa. CellDeg für die Anzucht der Algen in Flüssigkultur. Zu dem Reaktor gehören zwei austauschbare Kultivierungs-Plattformen, die auf einem Schüttler befestigt und in einem Brutschrank untergebracht werden (s. Abb. 3 und Abb. 4). Auf der ersten Plattform können insgesamt 33 kleine Photobioreaktoren mit einem Volumen von 10 mL parallel platziert werden, die zweite Plattform bietet Platz für neun Photobioreaktoren im Maßstab von jeweils 100 mL. Das Reaktorsystem erlaubt eine kontrollierte Beleuchtung mittels dimmbarer LED-Leuchte, CO₂-Begasung, Temperierung und Durchmischung der Kulturen. Alle Parameter können variiert und entsprechend optimiert werden. Zur Beurteilung des Wachstums steht ein Sensor zur Verfügung, mit dem die optische Dichte (OD) regelmäßig gemessen werden kann (s. Abb. 3 links). Reproduzierbarkeit und Streuung der Ergebnisse werden über Mehrfach-Ansätze in den Parallel-Reaktoren erfasst.

Die notwendigen Schritte zur Erarbeitung günstiger Kultivierungsbedingungen für die Mikroalgen werden in den nächsten Abschnitten beschrieben.

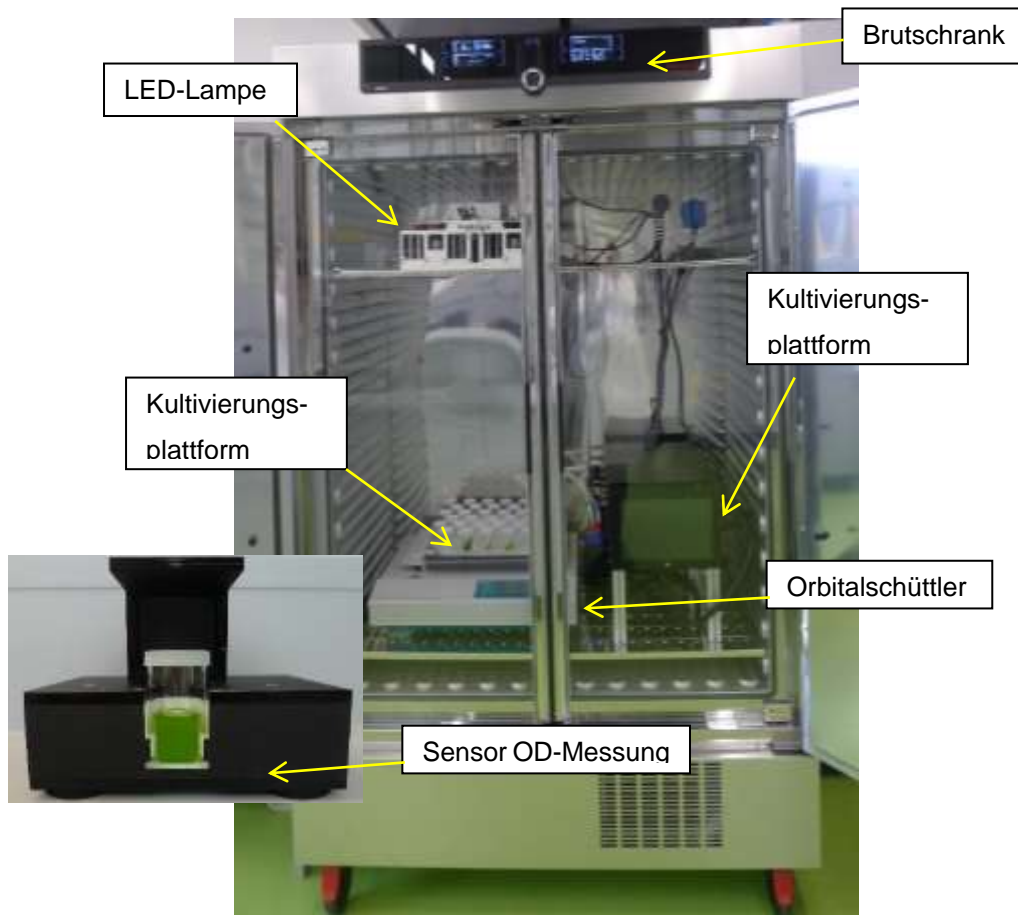


Abb. 3: Algenreaktor-System der Firma CellDeg mit Sensor zur OD-Messung.



Abb. 4: Kultivierungsplattformen des Algenreaktorsystems. Links: Plattform mit 33 10-mL-Reaktoren. Rechts: Plattform mit neun 100-mL-Reaktoren.

Temperatur

Geeignete Temperatureinstellungen für die Kultivierung der Mikroalgen wurden der Literatur entnommen. Allgemein lassen sich Mikroalgen bei 20 bis 25 °C kultivieren (Ras et al., 2013). Die optimalen Wachstumsbedingungen können je nach Gattung und Stamm variieren, für die angeschafften Mikroalgen wird jedoch prinzipiell eine Temperatur von 25 °C empfohlen (Harris, 2001, Putri et al., 2019, Singh, Singh, 2015, Zhang et al., 2019). Dies ermöglichte die zeitgleiche Anzucht aller Algen in dem Reaktorsystem.

CO₂-Begasung

Die Kultivierung von Mikroalgen in Photobioreaktoren findet gewöhnlich unter CO₂-Begasung statt, um Kohlenstofflimitierung zu vermeiden. Die Begasungsrate liegt üblicherweise zwischen 1 und 10 % (Yuvraj und Padmanabhan 2017). Für die ersten Versuche fand die Kultivierung bei einer niedrigen CO₂-Begasungsrate von 2 % im Volumenstrom statt. Pro Tag (24 h) bedeutet dies einen Verbrauch von 0,7 kg CO₂ bei einer Gesamt-Begasungsrate von 12 L/min.

Weitere Optimierungsversuche für die CO₂-Begasung wie niedrigere/höhere Konzentrationen wurden in AP 3 durchgeführt.

Beleuchtung

Wichtigster Parameter der Algenkultivierung ist eine geeignete Beleuchtung. Neben Lichtqualität und Tag/Nachtzyklen hat die Lichtintensität einen besonders hohen Einfluss auf das Algenwachstum. Betrachtet wird dabei lediglich der für die Photosynthese relevante Lichtanteil zwischen 400 und 700 nm. Die Angabe erfolgt als Photonenflussdichte in $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. Optimale Werte liegen im Bereich von 30-400 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ (Maltsev et al., 2021). In Übereinstimmung mit der CO₂-Begasung wurden die Algenstämme zunächst bei niedriger Lichtintensität von 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ kultiviert und in AP 3 das Wachstumsverhalten bei höheren Lichtintensitäten untersucht.

Nährstoffzugabe

Für die Nährstoffzugabe erwies sich die Zusammensetzung eines in der Literatur gängigen Algenkulturmediums (BG11) am günstigsten (s. Tab. 3). Getestet wurden

außerdem die Medium-Empfehlungen der Stammsammlung für Algenkulturen der Uni Göttingen (SAG) und der Firma CellDeg. Bei den Medien der SAG wurde geringeres Wachstum als in dem BG11-Medium festgestellt. Das Medium der Firma CellDeg basiert auf einer speziell entwickelten Zusammensetzung von Salzen, die nur als Mischung käuflich zu erwerben ist. Aus wirtschaftlichen Gründen wurde entschieden, die Algen einheitlich mit BG11-Medium zu kultivieren.

Das Medium soll ggf. auch später dem Abwasser zugesetzt werden, um ausreichend Nährstoffe für das Algenwachstum bereitzustellen. Mit einem theoretisch berechneten CSB-Wert von ca. 10 mg/L ist nicht von einer nennenswerten Beeinträchtigung der Wasserqualität auszugehen, zumal die Substanzen während der Kultivierung von den Algen verstoffwechselt werden. Weitere kritische Medienkomponenten sind nicht enthalten.

Tab. 3: Zusammensetzung des Algenkulturmediums BG11.

Bestandteil	Konzentration [mg/L]	Berechneter CSB-Gehalt [mg/L]
NaNO ₃	1500	-
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	40	-
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	75	-
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	36	-
Zitronensäure	6	4,5
Ammoniumeisen(III)-citrat	6	4,5
EDTA-Na ₂	1	0,9
Na ₂ CO ₃	20	-
H ₃ BO ₃	6,10E-05	-
MnSO ₄ x H ₂ O	1,69E-04	-
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	2,87E-04	-
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	2,50E-06	-
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4 H ₂ O	1,25E-05	-

Alle Algenstämme ließen sich erfolgreich bei 25 °C, niedriger CO₂-Begasung von 2 % und 100 µmol/m²s Beleuchtungsintensität in dem Reaktorsystem der Firma CellDeg mit dem Kultivierungsmedium BG11 anziehen. Auffällige Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit traten nicht auf.

3.1.3 Erste Versuche zur Lipidbildung

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Lipidbildung von Mikroalgen unter Stress-Bedingungen gesteigert werden kann. Der Stoffwechsel reagiert z. B. auf Nährstoffmangel damit, primäre Speicherstoffen wie Stärke zugunsten energiereicher Speicherstoffen wie den Neutrallipiden (Triacylglyceride) abzubauen. Aus Triacylglyceriden wird nach der Veresterung in Fettsäuremethylester Biodiesel gewonnen. Als mögliche Stressansätze kommen Nitrat- bzw. Phosphatmangel in Frage. Nitratmangel gilt als zuverlässige Maßnahme, Phosphatmangel ist weniger gut untersucht (Yang et al., 2018).

Aus diesem Grund wurden die ersten Versuche bei Nitratmangel durchgeführt. Nachteil dieser Methode ist, dass der Nährstoffmangel das Algenwachstum verlangsamen kann. Zur Kompensation bietet es sich an, die Kultivierung in zwei Phasen aufzuteilen. In der ersten Phase findet die Kultivierung bei vollständigem Nährmedium statt, um möglichst schnell hohe Zelldichten zu generieren. In der zweiten Phase, der Produktionsphase, wird unter Nährstoffmangel weiterkultiviert (Mujtaba et al., 2012).

Durchführung

Die ausgewählten Algen wurden im CellDeg-Bioreaktor (10 mL Maßstab) bis zur exponentiellen Wachstumsphase mit vollständigem Nährmedium kultiviert. Anschließend erfolgte der Wechsel in die Produktionsphase durch einen Austausch mit Nitrat-freiem Medium.

Zum Nachweis der Lipidbildung wurde der Fluoreszenzfarbstoff Nilrot verwendet. Diese Nachweismethode ermöglicht trotz der kleinen Kulturvolumina eine zuverlässige Einschätzung der Lipidbildung. Der Farbstoff durchdringt in DMSO gelöst die Algenzellwand und bindet intrazellulär an Lipide (s. Abb. 5). Die Fluoreszenzintensität korreliert dabei mit der Menge an gebildeten Lipiden (Held, Raymond, 2011). Erschwert wird die Messung durch die starke Zellwand bestimmter Algenstämme, die das Durchdringen des Farbstoffs in die Zelle verhindern (Ren et al., 2015). In dem Fall ist ein Aufschluss der Zellwand, z. B. mittels Ultraschall oder einer Schwingmühle erforderlich. Während die Messungen für die Algenstämme *C. vulgaris*, *C. oblonga* und *C. oleofaciens* ohne Aufschluss durchgeführt werden konnten, musste für den Algenstamm *S. acuminatus* eine geeignete Methode erarbeitet werden. Als günstig

erwies sich der Einsatz einer Schwingmühle, die an der FE2 zur Verfügung steht. Hier besteht die Möglichkeit der Verwendung von Mikroreaktionsgefäßen mit geringen Probenvolumina (max. 1,5 mL).

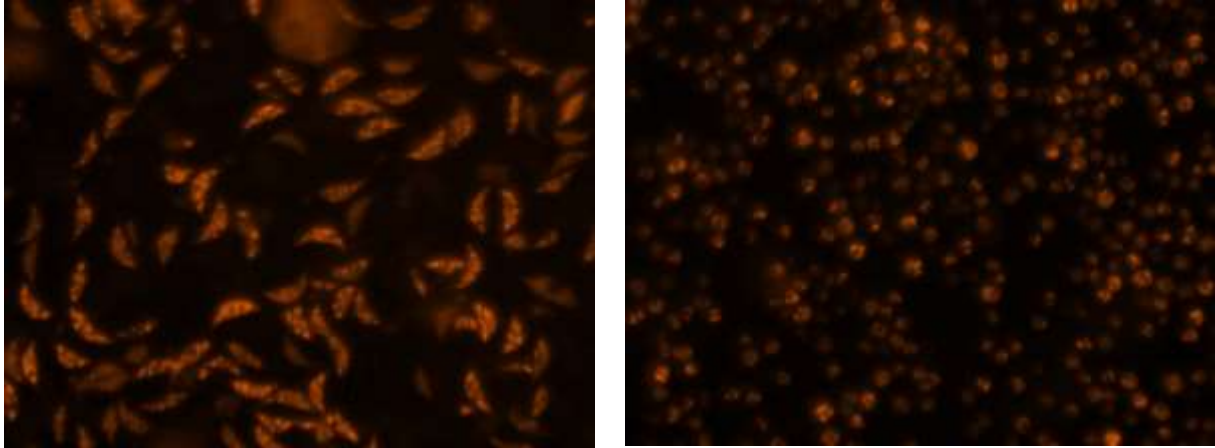


Abb. 5: Fluoreszenzfärbung von Mikroalgen-Zellen. In goldener Farbe sind die Lipidtröpfchen erkennbar. Links: *S. acuminatus*. Rechts: *C. oleofaciens*.

Ergebnisse

Alle Mikroalgenstämme wiesen bei der Nitratreduktion eine signifikante höhere Lipidbildung auf. Die jeweils besten Ergebnisse der täglichen Messungen sind in Abb. 6 zusammengestellt. Am besten war das Ergebnis für die Mikroalge *C. oblonga*. Hier wurde der Lipidgehalt im Vergleich zur Kontrolle um den Faktor 6 gesteigert, für den Stamm *C. oleofaciens* wurde insgesamt die höchste Fluoreszenz gemessen. Im Gegensatz dazu wurde bei der Mikroalge *S. acuminatus* nur eine Steigerung um den Faktor 1,8 erreicht. Hier könnten weitere Stressbedingungen wie z. B. eine Kombination aus Nitrat- und Phosphatmangel getestet werden (s. AP 3).

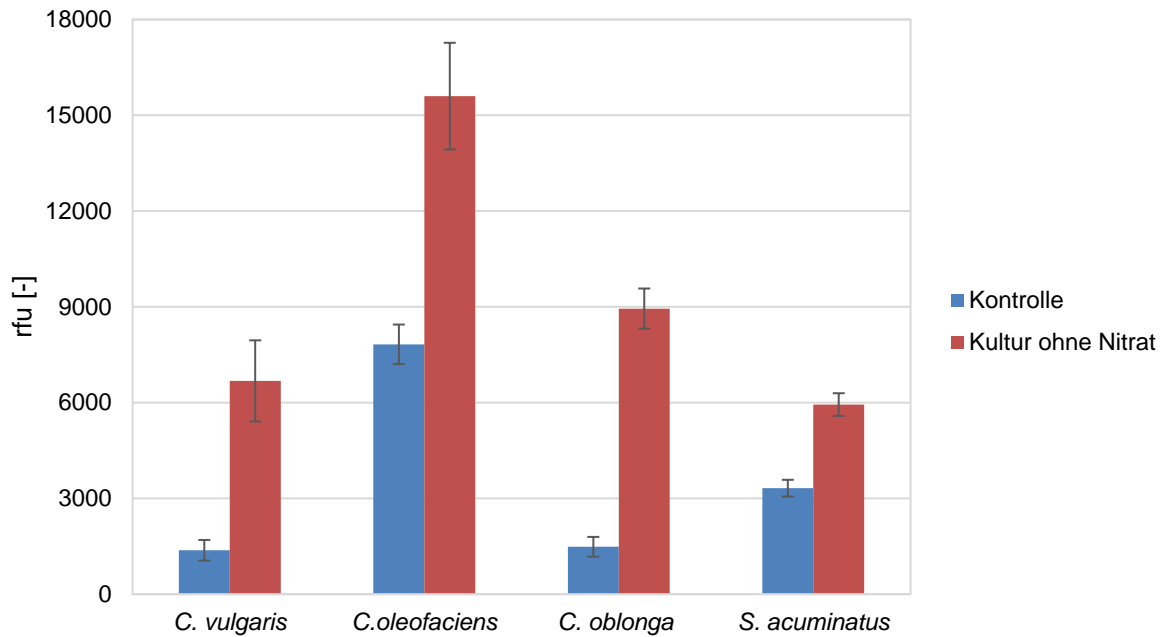


Abb. 6: Lipidbildung bei Nitratmangel. rfu: *relative fluorescence units*.

Die ersten Ergebnisse wurden insgesamt als vielversprechend eingestuft und konnten als Grundlage für die Erarbeitung der späteren Versuche im Technikumsmaßstab verwendet werden.

3.1.4 Zusammenfassung AP 1

Alle vier beschafften Mikroalgen konnten in dem CellDeg Bioreaktor erfolgreich mit einem gängigen Algenkulturmedium (BG11) angezogen werden. Die Kultivierung unter Nitratmangel erwies sich in den ersten Vorversuchen als günstig für die Lipidbildung.

3.2 Arbeitspaket 2: Auswahl und Voruntersuchung geeigneter Papierfabriksabwässer

Im Rahmen des zweiten Arbeitspaketes wurden die Abwasserreinigungsanlagen mehrerer Papierfabriken mit unterschiedlichen Faserstoffquellen beprobt.

Aus Voruntersuchungen ist bekannt, dass Abwässer von Papierfabriken endokrine Wirkungen haben können. Dies betrifft im Wesentlichen Altpapier verarbeitende Papierfabriken, aber auch Papierfabriken, die Holzstoff als Faserstoffquelle nutzen. Die Untersuchungen wurden daher mit Abwässern aus einer Papierfabrik

durchgeführt, die aus 100 % Altpapier Wellpappenrohpaper herstellt (Papierfabrik A), einer Tissue-Papierfabrik, in der unterschiedliche Hygienepapier-Produkte mit und ohne Altpapier produziert werden (Papierfabrik B) und aus einer Papierfabrik, in der grafische Papiere aus einer Mischung aus Altpapier, Holzstoff und Zellstoff hergestellt wird (Papierfabrik C). Untersucht wurde jeweils das Abwasser aus dem Zulauf zur Abwasserreinigung, nach der ersten biologischen Reinigungsstufe und im Ablauf der Nachklärung. Die Probenahme in den Papierfabriken erfolgte durch die FE 1. Anschließend wurden sämtliche Abwässer auf allgemeine Abwasserparameter (chemische Analytik), endokrine Wirkung und Algenwachstum untersucht.

3.2.1 Chemische Analytik

In der FE 1 erfolgte die Bestimmung der wichtigsten Abwasserparameter CSB, AOX, pH-Wert, Stickstoff (ges.), Nitrat-N, Ammonium-N und ortho-Phosphat-P.



Abb. 7: Abwasserprobe der Nachklärung aus Papierfabrik A in 1 L Glasflasche.

Die Analytik der allgemeinen Abwasserparameter erfolgte in der FE1 mittels Küvettentests (Spectroquant, Fa. Merck). Für die CSB-Messung wurden die Abwasserproben schwarzbandfiltriert, die pH-Messung erfolgte in der unfiltrierten Originalprobe, für alle anderen Parameter wurden die Abwasserproben über ein 0,45 µm-Filter membranfiltriert.

Tab. 4: Abwasserparameter in Abwasserproben der Papierfabriken A, B, C

	CSB mg/L	pH	Nitrat-N mg/L	NH4-N mg/L	Gesamt- N mg/L	Ortho- Phosphat-P mg/L
Papierfabrik A						
Zulauf ARA	7.336	7,2	2,4	0,88	4,7	*
Ablauf Aerobie	321	7,8	1,6	0,65	5,2	0,38
Ablauf Nachklärung	232	7,9	1,3	0,55	5,3	0,41
Papierfabrik B						
Zulauf ARA	4.810	5,7	*	0,29	9,2	*
Ablauf Aerobie	170	7,5	2,1	0,49	8,1	0,24
Ablauf Nachklärung	165	7,5	2,5	0,61	9,1	0,26
Papierfabrik C						
Zulauf ARA	1.972	7,1	4,1	0,76	4,1	2,91
Ablauf 1. biol. Reinigungsstufe (Aerob Hochl.)	1.063	7,6	4,0	0,06	3,9	0,12
Ablauf Nachklärung	346	8,0	2,7	0,34	5,1	0,17

* Proben konnten wegen zu starker Trübung nicht untersucht werden.

Nach Auswahl einer geeigneten Abwasserqualität für die Algenkultivierung in diesem Projekt wurden von FE 1 jeweils nur von diesem Abwasser (Papierfabrik A, Ablauf Nachklärung) regelmäßig Abwasserproben gezogen und als Medium für die Algenkultivierung an die FE 2 gebracht. Parallel dazu wurden noch am Probenahmetag in der FE 1 die Abwasserparameter dieser Probe analysiert, um zu überprüfen, ob die Abwasserproben einem regulären Betriebszustand der ARA entsprechen. Die Ergebnisse sind als Min-Max-Werte Tab. 5 zu entnehmen.

Tab. 5: Untersuchungsergebnisse (Min-Max) der regelmäßigen Untersuchungen des Abwassers (Ablauf Nachklärung Papierfabrik A)

	CSB mg/L	pH	Nitrat-N mg/L	NH ₄ -N mg/L	Gesamt- N mg/L	Ortho- Phosphat-P mg/L	AOX µg/L
Ablauf Nachklärung	191 - 282	7,8 – 7,9	0,60 – 1,60	0,05 – 4,47	4,85 - 9,50	0,32 – 0,68	125 - 181

Das Abwasser wies während des Untersuchungszeitraumes eine stabile organische Fracht (gemessen als CSB) auf. Der pH-Wert war nahezu konstant im leicht alkalischen Bereich (7,8 bis 7,9). Die Werte für die Stickstoff- und Phosphorkonzentrationen waren stabil auf geringem Niveau.

3.2.2 Summenparameter Endokrine Wirkung

Endokrin wirksame Substanzen gehören zu den am meisten besorgniserregenden Schadstoffen in Abwässern. Die Substanzen können, nach Eintritt in das Trinkwasser, erhebliche Gesundheitsschäden hervorrufen. Aus diesem Grund sollen Abwasser-Reinigungsverfahren zur Entfernung endokrin wirksamer Substanzen vor dem Einlass in natürliche Gewässer erweitert werden (Azizi et al., 2022).

Die Untersuchungen zum Nachweis der Substanzen erfolgte an der FE 2 mithilfe eines *in vitro*-Biotests mit rekombinanten Hefestämmen, zusätzlich zur Einzelstoffanalytik. Vorteil des Hefetests ist, dass hierbei der Summenparameter der endokrinen Wirkung gemessen wird und somit auch unbekannte Substanzen erfasst werden.

Verfügbar sind zwei Varianten, mit denen entweder die androgene oder die östrogene Wirkung gemessen werden kann. Gleichbleibend negative Befunde zu Beginn der Datenerhebung bestätigten, dass keine androgen wirksamen Substanzen im Abwasser vorhanden waren. Der Fokus wurde daher auf die östrogene Wirkung gelegt.

Das Testsystem (*Recombinant Yeast Estrogen Assay, R-YEA*) basiert auf einem Hefestamm, der sowohl das Gen für einen humanen Estrogenrezeptor (hER) als auch ein Reporter-gen (*lacZ*) trägt. Bei Aktivierung des Rezeptors durch entsprechende hormonelle Substanzen im Testgut (Abwasser) bindet dieser als Transkriptionsfaktor an ein *hormon responsive element* (HRE) im Zellkern. An das HRE ist ein Reporter-gen gekoppelt, das für die β -Galaktosidase codiert und nach Bindung des

Transkriptionsfaktors exprimiert wird. Die Aktivität des Enzyms korreliert mit der Konzentration an hormonellen Substanzen. Der Aktivitätsnachweis erfolgt nach Hinzugabe eines passenden Substrats (o-Nitrophenol-Galaktopyranosid, ONPG) über eine Farbreaktion. Bei der enzymatischen Spaltung entsteht gelb gefärbtes Nitrophenol (zu messen bei 450 nm) und Galaktose (Gaido et al., 1997).

Die Durchführung des Tests erfolgt in Mikrotiterplatten. Es wurden stets sowohl Negativ- als auch Positivkontrollen (NK, PK) mitgeführt. Die Auswertung hängt von dem Zellwachstum der Hefezellen ab. Liegt das Wachstum mehr als 30 % unterhalb der Negativkontrolle, ist von einer zytotoxischen Probe auszugehen. Die östrogene Wirkung ist dann erst wieder ab der Verdünnungsstufe ermittelbar, in der das Wachstum oberhalb von 70 % liegt.

Der Mechanismus des Tests ist in Abb. 8 schematisch dargestellt.

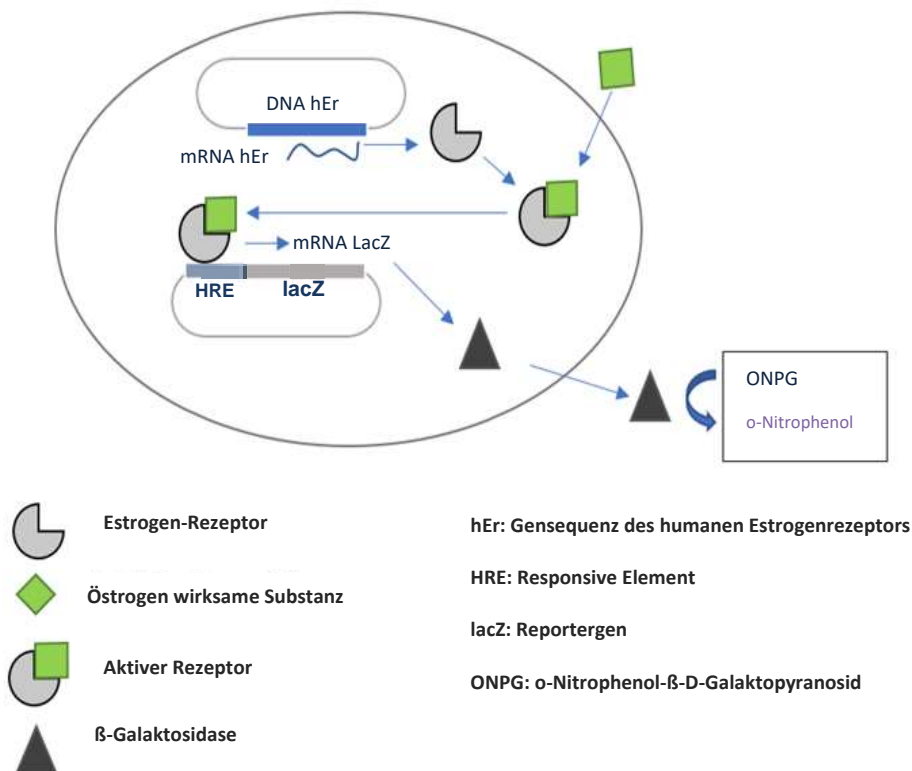


Abb. 8: Mechanismus des R-YEA (verändert nach Bazin et al. 2017).

Die Nachweis-Untersuchungen erfolgten mit nativen Abwässern und Konzentraten der gleichen Abwässer. Die Konzentrierungen wurden mittels Festphasen-Extraktion durchgeführt. Dabei wurden die organischen Substanzen an der stationären Phase Serdolit PAD I absorbiert, mit Aceton eluiert, das Aceton mittels Stickstoffs eliminiert und der Extrakt in DMSO aufgenommen. Der Faktor der Aufkonzentrierung betrug

10.000 und diente dem Nachweis von Substanzkonzentrationen unterhalb der Test-Nachweisgrenze.

Es wurden folgende Daten aufgenommen:

Tab. 6: Ergebnisse zur östrogenen Wirkung in den Papierfabriken A, B und C.

Papierfabrik	A	B	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Östrogene Wirkung	+	○	-	○	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
Zytotoxizität	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	n.b.	+	+

Legende:

	Östrogene Wirkung	Zytoxizität native Probe (Hefewachstum in % zur NK)
+	< 3,25-fache Anreicherung bzw. natives Abwasser	0-50 %
○	> 6,5-fache Anreicherung	50-70 %
-	Kein Nachweis bei > 52-facher Anreicherung	70-100 %

Um die Stärke der östrogenen Wirkung zu vergleichen, wurden die Ergebnisse in drei Kategorien mit hoher (+), mittlerer (○) und niedriger (-) Wirkung aufgeteilt (s. Legende). Die einmalige Untersuchung der drei unterschiedlichen Papierfabriken zu Beginn des Projektes diente der Werksauswahl für die zukünftigen Versuche. In Papierfabrik A war die Restbelastung an östrogen wirkenden Stoffen am höchsten und somit auch die Notwendigkeit einer zusätzlichen Reinigung. Das Algenwachstum war in diesem Abwasser ebenfalls zufriedenstellend (s. Abschnitt 3.2.3), sodass die Papierfabrik für weitere Untersuchungen gewählt wurde.

Im Zeitraum der Berichtserstattung wurden insgesamt elf weitere Proben untersucht. Davon wiesen fünf eine relativ hohe, eine Probe eine mittlere und fünf keine östrogene Wirkung innerhalb der Nachweisgrenzen des Testsystems auf.

Zur Einschätzung der realen Belastung können die Ergebnisse als Ethinylestradiol-Äquivalente (EE₂) angegeben werden. EE₂ hat im R-YEA eine Nachweisgrenze von 1,35 ng/L (4,55 pM). Demnach lag in sechs Proben im nativen Zustand mindestens eine Konzentration von 0,4 ng/L EE₂-Äquivalenten vor und in zwei Proben mindestens eine Konzentration von 0,2 ng/L EE₂-Äquivalenten. Alternativ wurde der

Detektionsbereich von Bisphenol A im R-YEA überprüft. Hier liegt die Nachweisgrenze bei 80 µg/L.

Auffällig war außerdem, dass zehn der Proben im nativen Zustand zytotoxisch auf die Hefezellen wirkten, sodass die östrogene Wirkung nicht bestimmt werden konnte. In der Literatur wird als möglicher Grund das Vorhandensein von elementarem Schwefel im Abwasser angegeben, der inhibierend auf das Hefe-Wachstum wirkt (Citulski, Farahbakhsh, 2012). Dies würde auch erklären, warum die Hefen bei den aufkonzentrierten Proben nach Extraktion keine Wachstumsstörung aufwiesen.

An dieser Stelle wurde somit ersichtlich, dass die geplante Bestimmung der östrogenen Wirkung mit dem Hefetest vor und nach der Algenkultivierung nicht umsetzbar war. Hierzu muss das Hefewachstum in den Proben gewährleistet sein, zudem war die Konzentration der betreffenden Substanzen in den nativen Proben offensichtlich zu niedrig. Die Idee, im Vorfeld eine Aufkonzentrierung der Proben einzuführen, wurde nach Rücksprache mit einer Toxikologin verworfen. Vermutlich beeinflusst die veränderte Probenzusammensetzung nach der Algenkultivierung die Extraktionseffizienz und könnte so zu falsch-negativen Ergebnissen führen (Waldmann 2022).

Somit war der Nachweis der östrogen wirkenden Substanzen in den nativen Abwasserproben vor und nach der Algenkultivierung nur mittels chemischer Einzelstoffanalytik möglich, die in AP 5 vorgesehen ist. Hier findet die Hochskalierung der Versuche in den Technikumsmaßstab statt, bei der ausreichend Kulturvolumen für die Analytik vorhanden ist.

3.2.3 Algenwachstum in Abwasserproben

Im Anschluss an die Bestimmung der allgemeinen Abwasserparameter und der östrogenen Wirkung wurde das Algenwachstum in den Abwasserproben der Papierfabriken bewertet.

Durchführung

Die Abwasserproben wurden mit dem Nährstoffkonzentrat des in AP 1 ausgewählten Algenkulturmediums (BG11) angereichert und mit Algensuspensionen aus exponentiell wachsenden Vorkulturen inokuliert. Die maximale Abwasserkonzentration wurde durch den Anteil des Nährstoffkonzentrats limitiert und betrug 90 %. Die

Versuche fanden in dem Reaktorsystem der Fa. CellDeg, wie in AP 1, bei 2 % CO₂, 100 µmol/m²s Lichtintensität und 25 °C statt und dauerten in der Regel zwischen sieben und zehn Tagen. Während der Kultivierung wurde das Algenwachstum über die optische Dichte bei 750 nm bestimmt. Zur Kontrolle wurden bei diesen ersten Versuchen stets Kulturen in konventionellem Algenkulturmedium ohne Abwasser mitgeführt, um das Wachstum vergleichen zu können.

Ergebnisse

Abwasser erwies sich grundsätzlich für fast alle Algenstämme als geeignete Kulturmatrix. Beispielhaft ist in Abb. 9 die Wachstumskurve der Mikroalge *C. vulgaris*

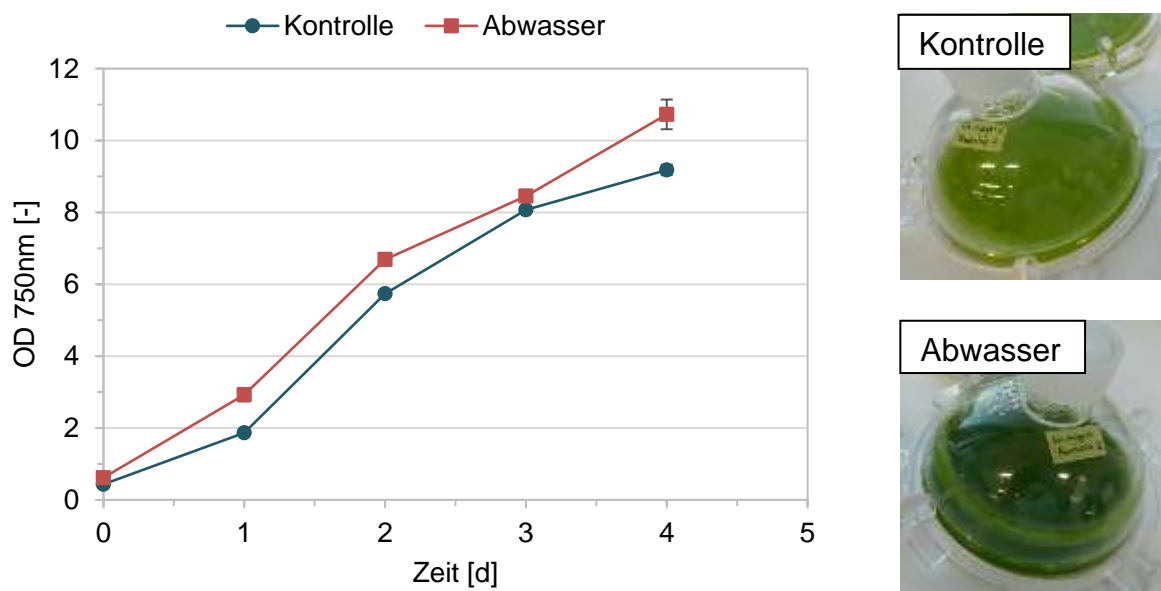


Abb. 9: Wachstumskurve und Fotos der Mikroalge *C. vulgaris* in einer Abwasserprobe der PF A im Vergleich zur Kontrolle in Algenkulturmedium (BG11).

gezeigt. Dargestellt ist der Anstieg der Zelldichte innerhalb von vier Tagen. Auffällig war, dass die Kultur im Abwasser sogar leicht erhöhte Zelldichten als in der Kontrolle erreichte. Erkennbar war auch eine deutlich dunklere Grünfärbung der Kulturen, was auf einen höheren Chlorophyllgehalt schließen ließ und eine gute Adaption an das Abwasser belegte.

Für den Algenstamm *C. oblonga* waren die Versuchsergebnisse weniger zufriedenstellend. Es fiel auf, dass die Algen eine stark viskose Zellmatrix bildeten, was die Handhabung der Kulturen erschwerte. Beispielsweise konnten die chemischen Abwasserparameter und die Trockenmasse nicht bestimmt werden, für

die im Vorfeld eine Filtration des Kulturüberstands erforderlich ist. Da bei den übrigen drei Algenstämmen diese Eigenschaft nicht aufgetreten war, wurde an dieser Stelle eine erste Selektion vorgenommen und alle nachfolgenden Versuche auf die Algenstämme *C. vulgaris*, *C. oleofaciens* und *S. acuminatus* beschränkt.

Auf Grundlage der ersten Ergebnisse erfolgten in AP 2 fünf weitere gezielte Untersuchungen.

Vergleich Papierfabrik A, B, C

Im Abwasser der Papierfabriken A und C gelang die Anzucht der drei Algenstämme. Aus der Papierfabrik B wies eine der Proben starke Trübung auf, sodass der Kultivierungsversuch unterlassen wurde. In dem Fall kann aufgrund der Trübstoffe die ausreichende Versorgung der Algen mit Licht nicht gewährleistet werden. Bei einem weiteren Versuch mit Abwasser dieser Papierfabrik traten Wachstumshemmungen auf.

Zur Auswahl eines geeigneten Papierfabriksabwassers für die nachfolgenden Untersuchungen wurden somit Papierfabrik A und C in Betracht gezogen. Im Abwasser der Papierfabrik C konnten im Gegensatz zu Papierfabrik A keine östrogen wirksamen Substanzen nachgewiesen werden (s. Tab. 6). Nur Papierfabrik A erfüllte somit die beiden Kriterien „Bedarf an zusätzlicher Abwasserreinigung“ und „günstige Voraussetzungen für das Algenwachstum“ und wurde im Laufe des Projekts weiter beprobt.

Zulauf ARA, Ablauf Aerobie, Ablauf Nachklärung

Aus bereits erfolgten Forschungsarbeiten der FE1 ist bekannt, dass im Ablauf der Nachklärung von Abwässern der Papierindustrie endokrin wirksame Substanzen enthalten sein können (Kersten, 2009a). Daraus geht hervor, dass die biologische Reinigung nach den üblichen Verfahren nicht ausreicht, diese Substanzen erfolgreich zu eliminieren. Um die Freisetzung der gesundheitsgefährdenden Substanzen zu vermeiden, ist eine zusätzliche Klärung, z. B. mithilfe von Mikroalgen, anzustreben. Zusätzlich kommen jedoch auch die vorherigen Abwasserreinigungsstufen für das Vorhaben in Frage, die über eine höhere Nährstoffkonzentration verfügen. Unter dem Aspekt einer möglichen Kostenreduktion fand ein Versuch zur Kultivierbarkeit der

Mikroalgen in den drei Reinigungsstufen Zulauf Abwasserreinigungsanlage (ARA), Ablauf Aerobie und Ablauf Nachklärung statt.

In Abb. 10 sind die Ergebnisse des Versuches dargestellt. Mit Ausnahme der Kultur im Zulauf der ARA stiegen die Zelldichten während der ersten vier Tage exponentiell an. Am höchsten war das Wachstum in der Kontrolle, gefolgt von der Kultur im Ablauf der Nachklärung. Bei der Kultur im Ablauf der Aerobie war die Zelldichte an Tag 7 um etwa 40 % im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Im Zulauf der ARA war kein Algenwachstum möglich. Diese Abwasserprobe war toxisch für die Mikroalgen.

Auf Grundlage der Versuchsergebnisse wurde der Vorschlag einer vorherigen Reinigungsstufe verworfen und entschieden, den Fokus auf das Abwasser der Nachklärung zu legen. Dieses war für das Algenwachstum am meisten geeignet, zudem bestätigen die Ergebnisse, dass hier noch Bedarf für eine zusätzliche Reinigung vorhanden ist.

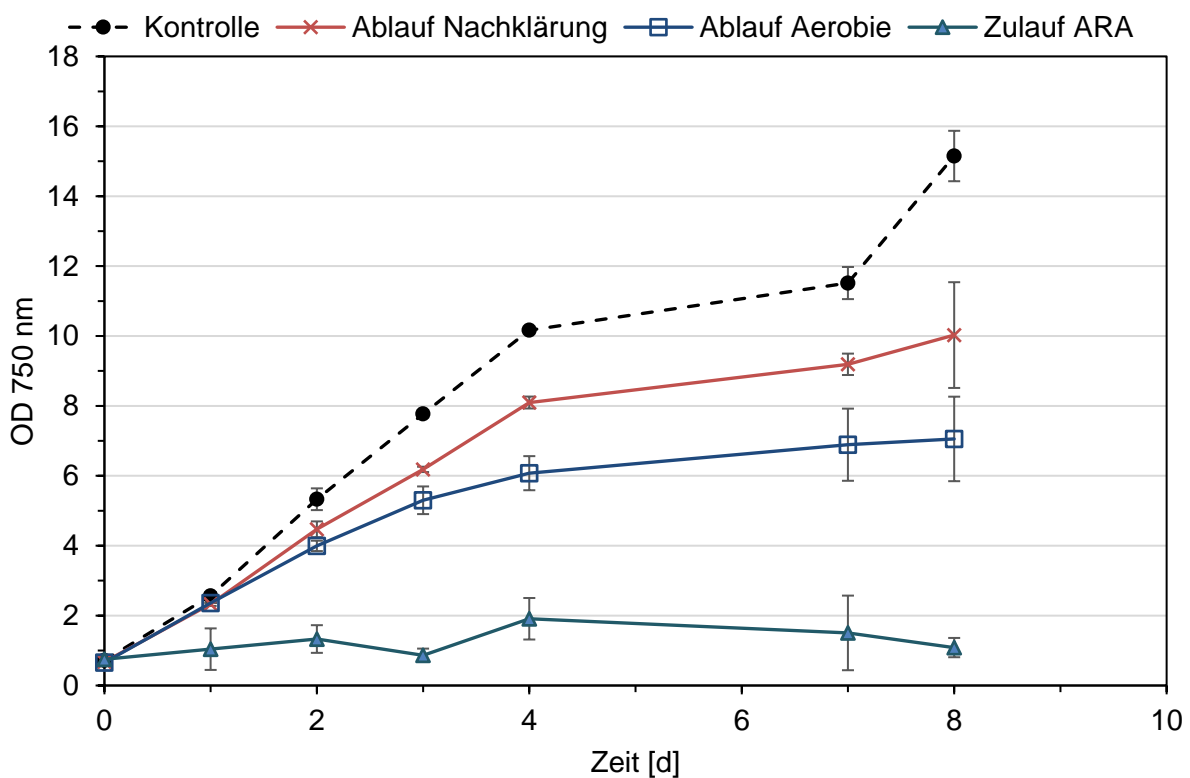


Abb. 10. Wachstumskurven der Mikroalge *C. vulgaris* in verschiedenen Reinigungsstufen der Abwasserreinigungsanlage von PF B.

Abwasser-Vorbehandlung

Zur Bestätigung des Algenwachstums in der PF A fanden zunächst drei weitere Probennahmen und Anzuchten bei einem Abwasseranteil von 90 % statt. Ein stabiles Wachstumsverhalten konnte zunächst nicht reproduziert werden. In zwei Proben wurde eine Hemmung des Wachstums im Abwasser festgestellt, bei einer Probe lag nach sieben Tagen ein vollständiges Absterben der Kulturen vor.

Als Störungsquelle wurden Kontaminationen mit *Paramecien* identifiziert. Mittels mikroskopischer Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass eine parallele Vermehrung dieser Organismen stattfand (s. Abb. 11). Aus der Literatur ist bekannt, dass es sich dabei um natürliche Fressfeinde von Mikroalgen handelt und deren Auftreten bei Verfahren zur Abwasserbehandlung nicht unüblich ist (Day et al., 2017, Tejido-Nuñez et al., 2019). Als wirksame Gegen-Maßnahmen werden Bestrahlung mit UV-Licht, Erhitzen bzw. Autoklavieren, Ultraschall und Filtration vorgeschlagen (Cho et al., 2011, Montemezzani et al., 2015). An der FE2 sind zwei Filtrationseinheiten mit Vakuumpumpe vorhanden, mit denen batchweise 1 L Flüssigkeit filtriert werden

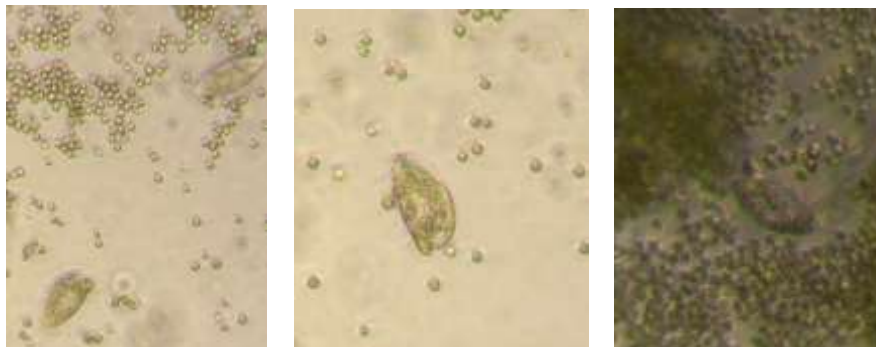


Abb. 11: Mikroskopische Aufnahmen zur Kontamination von Paramecien in Algenkulturen.

können. Aufgrund der einfachen Durchführbarkeit wurde die Filtration zur Abwasser-Vorbehandlung getestet. Die Ausführung erfolgte in zwei Stufen mit 20 µm- bzw. 5 µm Membranfiltern. Mikroskopische Kontrollen bestätigten, dass eine effiziente Entfernung der 50-300 µm großen Organismen möglich war. Es gelang, die Algen bei allen folgenden Labor-Versuchen mit Abwasser stabil wachsen zu lassen.

Das Thema wurde in Literaturrecherchen weiterverfolgt. Dabei stellte sich heraus, dass verschiedene Mikroalgen unterschiedlich resistent gegenüber Kontaminationen sind. Beispielsweise wird der Gattung *Scenedesmus* nachgesagt, besonders gute Abwehrmechanismen zu besitzen. Diese Algen sind dazu in der Lage, Zellkolonien mit erhöhten Schutz vor Fressfeinden auszubilden (Lüring, 2003). Im späteren Verlauf

des Projektes wurde der Algenstamm aus diesem Grund erneut in unfiltriertem Abwasser kultiviert. Das Wachstumsverhalten war in dem Fall nicht signifikant unterschiedlich zu der filtrierten Abwasser-Kultur. Das Ergebnis lässt vermuten, dass in einer späteren Realisierung auf die umständliche Vorbehandlung verzichtet werden kann, möglicherweise können aber trotzdem Betriebsausfällen vorkommen.

PAM-Fluorometrie

Die PAM-Fluorometrie stellte sich als praktisches Bewertungskriterium für die Kultivierung im Abwasser heraus und soll daher in diesem Kapitel gesondert beschrieben werden. Interessant ist, dass die Methode u. a. zum Nachweis toxischer Substanzen in Gewässerproben eingesetzt wird. Das Messprinzip beruht darauf, die Organismen nach kurzer Dunkeladaption mit einem Lichtblitz anzuregen. Ausgewertet wird die Fluoreszenzstrahlung, die in Relation zur Photosyntheseaktivität steht. Aus dem Ergebnis wird der sogenannte Genty-Parameter berechnet, für den bei ungestörter Photosynthese-Aktivität Werte zwischen 50 und 75 % angenommen werden. Liegt der Wert darunter, ist von einer Hemmung des Photosynthese-Apparates, beispielsweise durch toxische Substanzen in Abwässern, auszugehen (Figueroa et al., 2013, Genty et al., 1989, Institut für Hygiene und Umwelt, 2022).

In Abb. 12 sind beispielhaft die Messergebnisse zur PAM-Fluorometrie nach 24 h Inkubation der Algen im Abwasser dargestellt. Nennenswerte Unterschiede zwischen

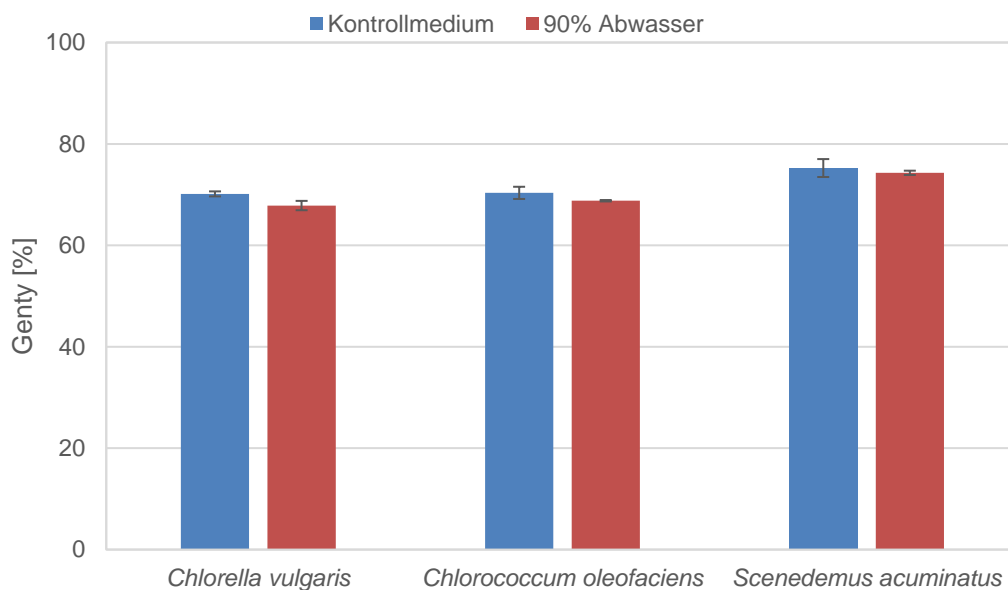


Abb. 12: Ergebnisse zur PAM-Fluorometrie der Algen im Abwasser im Vergleich zur Kontrolle. Die Messung fand nach 24 h Inkubation statt. n = 2.

den Kontroll- und Abwasserkulturen wurden nicht festgestellt. Die Versuche zeigten somit, dass grundsätzlich keine Photosynthese hemmenden Substanzen im Abwasser vorhanden waren.

3.2.4 Zusammenfassung AP 2

In AP 2 wurde die Abwasserzusammensetzung von drei verschiedenen Papierfabriken und das Algenwachstum im Abwasser verglichen. Die Papierfabrik A erwies sich mit hoher Belastung an östrogen wirkenden Stoffen und gutem Algenwachstum als am meisten geeignet. Bei dem Mikroalgenstamm *C. oblonga* wurden ungünstige Kulturbedingungen und Wachstumshemmungen festgestellt. Die Alge wurde bei den folgenden Versuchen nicht mehr berücksichtigt.

Von den verschiedenen Abwasserreinigungsstufen war das Abwasser der Nachklärung am meisten geeignet. Wichtigster Befund im weiteren Verlauf der Versuche war, dass auch bei den übrigen Algenstämmen Wachstumshemmungen auftreten können. Grund dafür sind Kontaminationen im Abwasser. Zur Verminderung wurde erfolgreich eine Abwasser-Vorbehandlungsmaßnahme (zweistufige Filtration) entwickelt.

Die Ergebnisse aus AP 2 wurden für die Planung der nachfolgenden Versuche in AP 3-7 verwendet.

3.3 Arbeitspaket 3: Untersuchungen zum Wachstum von Mikroalgen in verschiedenen Papierfabriksabwässern und Optimierung der Versuchsdurchführung im Labormaßstab

Im Rahmen des dritten Arbeitspaketes erfolgten weitere Probennahmen in der Kläranlage der Papierfabrik A. Die Proben wurden an der FE 2 in Versuchen zur Optimierung des Algenwachstums im Abwasser verwendet. Es wurde ein zweistufiger Kultivierungsprozess erarbeitet (s. Abb. 13).

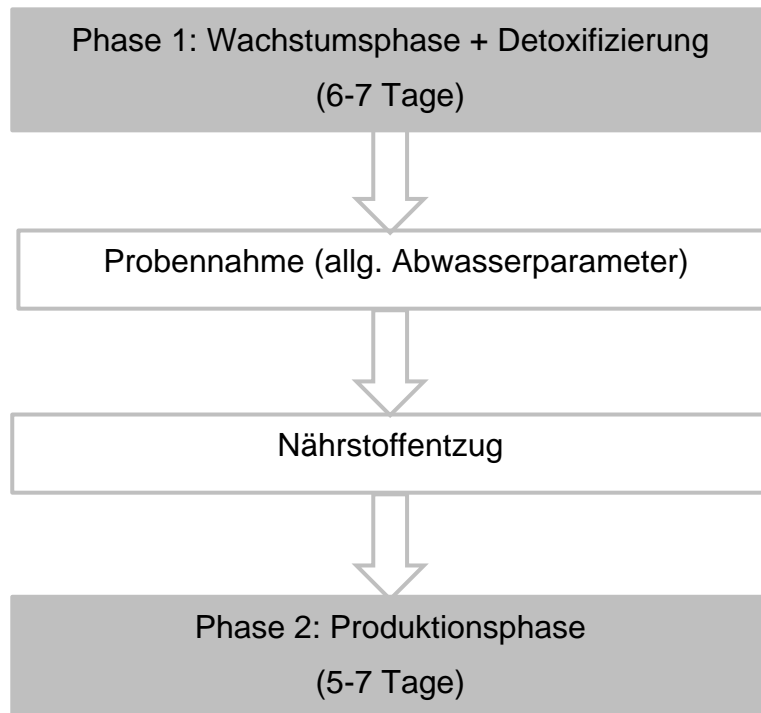


Abb. 13: Schema für die Algenkultivierung in zwei Phasen.

In Phase 1 wachsen die Mikroalgen unter optimierten Bedingungen. Hier findet auch die Detoxifizierung statt. An der FE 1 wird der Kulturüberstand nach der Biomasseernte auf chemische Abwasserparameter überprüft. Phase 2 dient der gezielten Produktion von Lipiden. Hier wird die Kultivierung unter den zuvor ermittelten Stressbedingungen (Nitrat-, Phosphatmangel) fortgesetzt.

Die Durchführung und Ergebnisse der Versuche werden in den folgenden Kapiteln beschrieben.

3.3.1 Optimierung der Versuchsdurchführung

In Vorbereitung auf die zweiphasige Kultivierung wurden zunächst mehrere Versuchsparameter optimiert.

Lichtintensität, CO₂-Begasung

Aus der Literatur ist bekannt, dass Lichtintensität und CO₂-Zufuhr das Algen das Wachstum am meisten beeinflussen (Kim et al., 2018). Zu geringe Lichtintensitäten wirken limitierend auf das Wachstum, oberhalb des Lichtsättigungspunktes kommt es zur Schädigung der Algenkulturen (Carvalho et al., 2011). Laut Herstellern des Algenbioreaktors ist es sinnvoll, die Lichtintensität an steigende Zelldichten anzupassen und darauf basierend die CO₂-Begasung einzustellen. Als Faustregel wird das Messergebnis der optischen Dichte mit 100 µmol/m²s multipliziert und die CO₂-Zufuhr proportional dazu berechnet. Die Hersteller erzeugen so in Kombination mit einem speziellen Kulturmedium in kurzer Zeit Hochzelldichten. Unter Berücksichtigung der vergleichsweise geringen Nährstoffkonzentrationen des hier verwendeten Kulturmediums wurde die Lichtintensität auf max. 400 µmol/m²s erhöht. Das Kultivierungsschema ist in Tab. 7 dargestellt.

Tab. 7: Einstellung der Lichtintensität und CO₂-Begasung in Anpassung an die Zelldichte.

Zelldichte (OD 750nm)	Lichtintensität [µmol/m ² s]	CO ₂ -Begasung [%]
0,5-1,5	100	2
1,5-2	150	3
2-4	200	4
> 4	400	8

Mit diesen Einstellungen war es möglich, verhältnismäßig hohe Wachstumsraten zu erzielen. In Abb. 14 sind die Wachstumskurve der drei Mikroalgen in einer Abwasserprobe dargestellt. Kein Stamm wies eine ausgeprägte lag-Phase auf, was eine gute Adaption an das Abwasser belegte. *C. vulgaris* erreichte bereits an Tag 4 die stationäre Phase und verfügte insgesamt über die niedrigste Zelldichte. *C. oleofaciens* und *S. acuminatus* zeigten ähnliches Wachstumsverhalten. Die optische Dichte dieser Kulturen stieg an Tag 6 bis auf einen Wert von knapp 15. Die gewählten Einstellungen wurden als geeignete Kulturbedingungen für die nachfolgenden Versuche betrachtet. Das Ziel des Vorhabens wurde erreicht. Das Wachstum könnte bei höheren Lichtintensitäten weiter getestet werden.

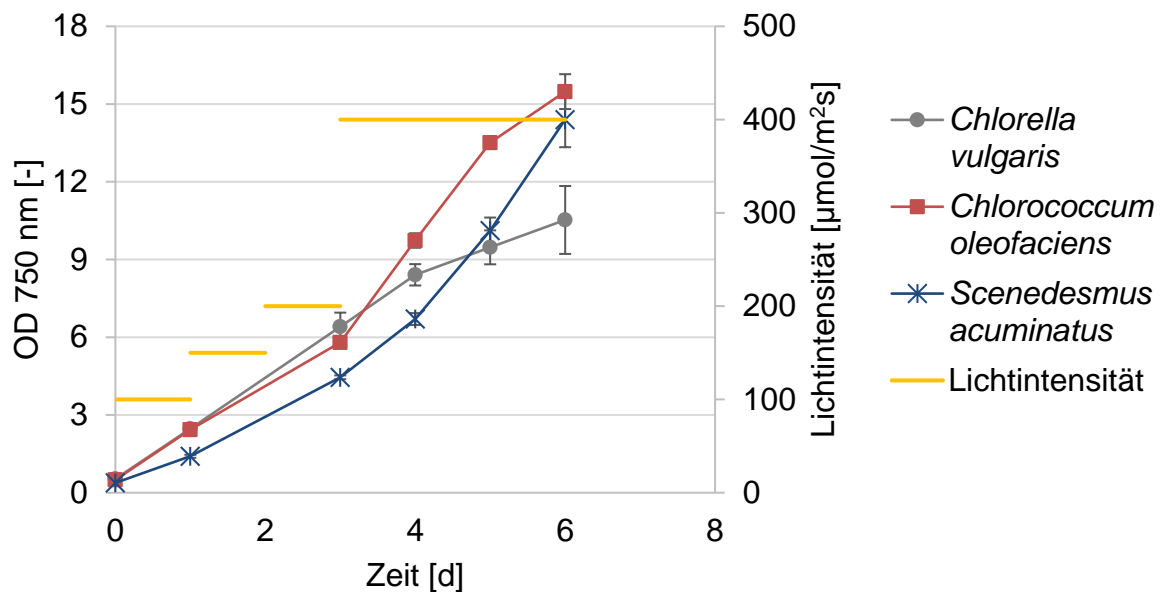


Abb. 14. Wachstumskurven (linke Ordinate) bei steigenden Lichtintensitäten (rechte Ordinate). Die CO₂-Begasung wurde proportional zur Lichtintensität von 2 % auf 8 % erhöht (s. Tab. 7).

Abwasserverdünnung

Eine Verdünnung des Abwassers kann das Algenwachstum laut Literaturergebnissen positiv beeinflussen (Pacheco et al., 2021, Saranya, Shanthakumar, 2019). Als Gründe werden die Verringerung der Trübung, der anorganischen und organischen Belastung und der Konzentration von gelösten Salzen aufgeführt.

Es wurde daher ein Versuch mit mehreren Abwasser-Verdünnungsstufen (50 %, 70 % und 90 %) durchgeführt. Die Verdünnungen erfolgten mit VE-Wasser, der Nährstoffanteil wurde in allen Ansätzen identisch eingestellt. Nach sechs Kultivierungstagen wurde die Flüssigkeit abfiltriert und die gewonnene Bio-Trockenmasse gravimetrisch nach Trocknung bei 105 °C ermittelt. Wie aus Abb. 15 hervorgeht, könnte der Abwasseranteil einen signifikanten Einfluss auf das Algenwachstum haben. Die Mikroalge *S. acuminatus* zeigte die stärkste Ausprägung dieses Effektes. Hier wurde über eine Verdünnung des Abwassers auf 50 % eine wesentliche Verbesserung des Algenwachstums erzielt. Auffällig ist, dass auch im Vergleich zur Kontrolle in reinem VE-Wasser ein günstigeres Wachstum vorlag. Vermutlich konnte dieser Algenstamm die im Abwasser vorhandenen Kohlenstoffquellen zum Aufbau von Biomasse metabolisch verwerten. Bei den

anderen beiden Stämmen wurden nur geringfügige Unterschiede zwischen den einzelnen Verdünnungsstufen festgestellt.

Keine der Mikroalgen zeigte eine Verschlechterung des Wachstums bei 90 % Abwasser im Vergleich zur Kontrolle, im Gegenteil lag die Biomasse-Ausbeute jeweils oberhalb der Kontrolle. Die Kultivierung ist somit unter Berücksichtigung der Nährstoffzugabe bei maximalen Abwasseranteil möglich, für den Mikroalgenstamm *S. acuminatus* könnte die Produktion über eine Verdünnung auf 50 % Abwasser

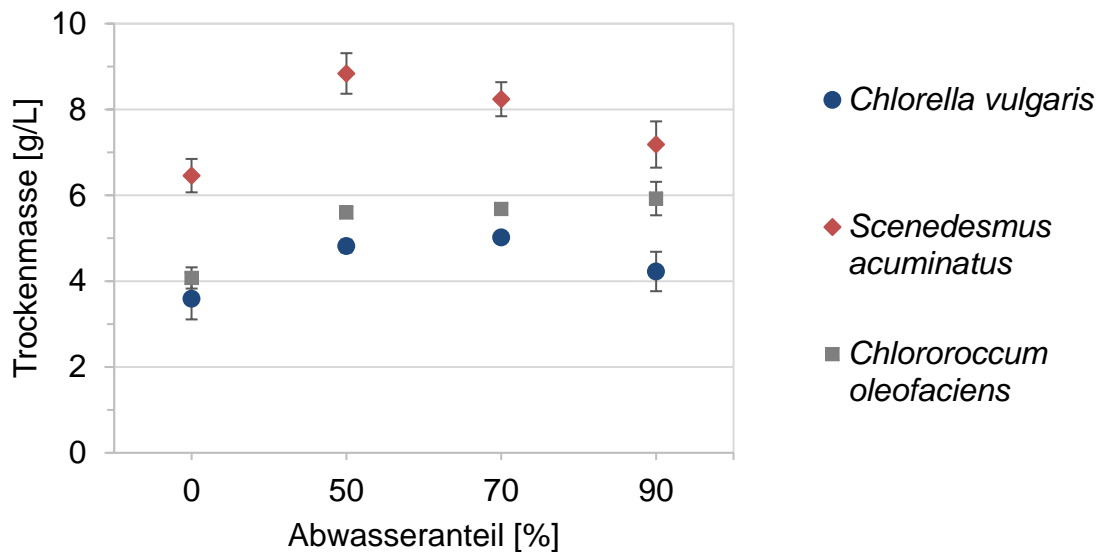


Abb. 15: Trockenmasse-Ausbeute bei verschiedenen Abwasser-Verdünnungsstufen.

signifikant gesteigert werden. Dieser Stamm wies auch insgesamt die höchste Produktivität und Robustheit auf.

Im Vergleich zu Literaturdaten liegen die Trockenmasseausbeuten oberen Bereich. Beschrieben werden Ausbeuten zwischen 0,9 und 8,22 g/L Trockenmasse (s. Tab. 8). Die ermittelten Kultivierungsbedingungen wurden daher als vielversprechend eingestuft und bei allen nachfolgenden Versuchen standardisiert angewendet.

Tab. 8: Übersicht zu Trockenmasseausbeuten in verschiedenen Abwässern aus der Literatur.

Mikroalge	Abwasser	Max. Trockenmasse [g/L]	Referenz
<i>Scenedesmus sp.</i>	Lederindustrie Abwasser	0,9	(Da Fontoura et al., 2017)
<i>Chlorococccum sp.</i>	Mischung Papier-/ Milchindustrie	0,94	(Sanusi, 2022)
<i>Chlorococccum sp.</i>	Kommunales Abwasser	1,33	(Mahapatra, Ramachandra, 2013)
<i>Chlorococccum infusium</i>	Industrielles Abwasser	1,45	(Karemore, Sen, 2015)

Mikroalge	Abwasser	Max. Trockenmasse [g/L]	Referenz
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Kommunales Abwasser	1,97	(Tan et al., 2015)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Brauereiabwasser	2,01	(Farooq et al., 2013)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Gärrückstand Papierfabrik	2,91	(Tao et al., 2017)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Textilindustrie	2,91	(Javed et al., 2022)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Nachklärung Papierfabrik	5,0	dieses Projekt
<i>Chlorococcum oleofaciens</i>	Nachklärung Papierfabrik	5,9	dieses Projekt
<i>Scenedesmus acuminatus</i>	Gärrückstand Papierfabrik	8,22	(Tao et al., 2017)
<i>Scenedesmus acuminatus</i>	Nachklärung Papierfabrik	8,8	dieses Projekt

3.3.2 Zweiphasige Kultivierung

Nach Optimierung der Kultivierungsparameter wurden die Algen in zwei Phasen kultiviert. In Phase 1 wachsen die Algen unter optimalen Bedingungen im Abwasser. In Phase 2 erfolgt die Kultivierung unter definierten Stressbedingungen. Neben dem in AP 1 bereits untersuchten Nitratmangel wurde zusätzlich die Kombination aus Nitrat- und Phosphat getestet. Vorteil dieser Variante wäre die unbedenkliche Freisetzung des Restwassers ohne jegliche Nährstoffrückstände nach der Algenernte.

Versuchsdurchführung:

Abwasserproben wurden mit Nährstoffen des BG11-Mediums versetzt und mit exponentiell wachsenden Algen-Vorkulturen inokuliert. Nach sieben Tagen wurde die Biomasse abzentrifugiert und in Medium ohne Nitrat bzw. ohne Nitrat und Phosphat weiterkultiviert. Zur Kontrolle wurde eine Kultur mit vollständigem Medium weitergeführt. Folgende Messwerte wurden während der Kultivierung aufgenommen:

- Zelldichte (OD bei 750 nm)
- Trockenmasse (gravimetrisch)
- Photosynthese (PAM-Fluorometrie)
- Zellzahl (Casy Zellzähler)
- Chlorophyll-Fluoreszenz (440/687 nm)
- Chlorophyllgehalt nach US EPA 446 (Arar, 1997)
- Neutrallipidgehalt (Fluoreszenzfarbstoff Nilrot)
- Protein- und Stärkegehalt

Aufgrund des geringen Kulturvolumens in den CellDeg-Reaktoren konnten sowohl die Chlorophyllgehaltsmessungen als auch Protein- und Stärkegehalts-Bestimmungen erst bei späteren Versuche im Technikumsmaßstab durchgeführt werden.

Ergebnisse

Beispielhaft sind in Abb. 16 die Ergebnisse für die zweiphasige Kultivierung mit der Mikroalge *S. acuminatus* gezeigt.

Die Zelldichte stieg in Phase 1 kontinuierlich an. In Phase 2 wurden sowohl in der Kontrollkultur als auch in der Nitrat-limitierten Kultur hohe Zelldichten erreicht. Die Kombination aus Nitrat- und Phosphatmangel führte zu einer erkennbaren Wachstumshemmung.

Die Ergebnisse zur Zellzahl zeigen keinen eindeutigen Wachstumsverlauf. Vermutlich beeinflussten Partikel aus der Abwassermatrix das automatische Zellzählsystem (Casy Counter). Die OD-Werte sowie Trockenmasse wurden deshalb als wichtigste Wachstumsparameter verwendet. Außerdem gibt auch die Chlorophyllfluoreszenz Aufschluss über die Zelldichte. Diese Werte erreichten nach zweitägiger Anpassungszeit in Phase 2 an Tag 10 in allen Kulturen den Maximalwert.

Die Photosyntheseaktivität der Mikroalgen reduzierte sich in Phase 1 auf unter 50 %, stieg jedoch in Phase 2 in der Kontrollkultur und der Nitrat-limitierten Kultur wieder auf hohe Werte an. In der Nitrat-Phosphat-limitierten Kultur blieb die Photosyntheseaktivität niedrig.

Am auffälligsten waren die Ergebnisse zum Neutrallipidgehalt. Hier konnten in der Nitrat-Phosphat-limitierten Kultur eine signifikante Steigerung der Lipidproduktion nachgewiesen werden. Dieser Befund konnte für die Auswahl der Stressbedingungen bei den späteren Versuchen im Technikumsmaßstab verwendet werden. Um die Wachstumshemmung unter diesen Bedingungen zu berücksichtigen, wurde die Lipid-Fluoreszenz in Verhältnis zur Biotrockenmasse gesetzt. Trotz des Verlustes konnte unter den Nitrat-Phosphat-limitierten Bedingungen eine bis zu 132 % höhere Lipidmenge als unter normalen Bedingungen gewonnen werden.

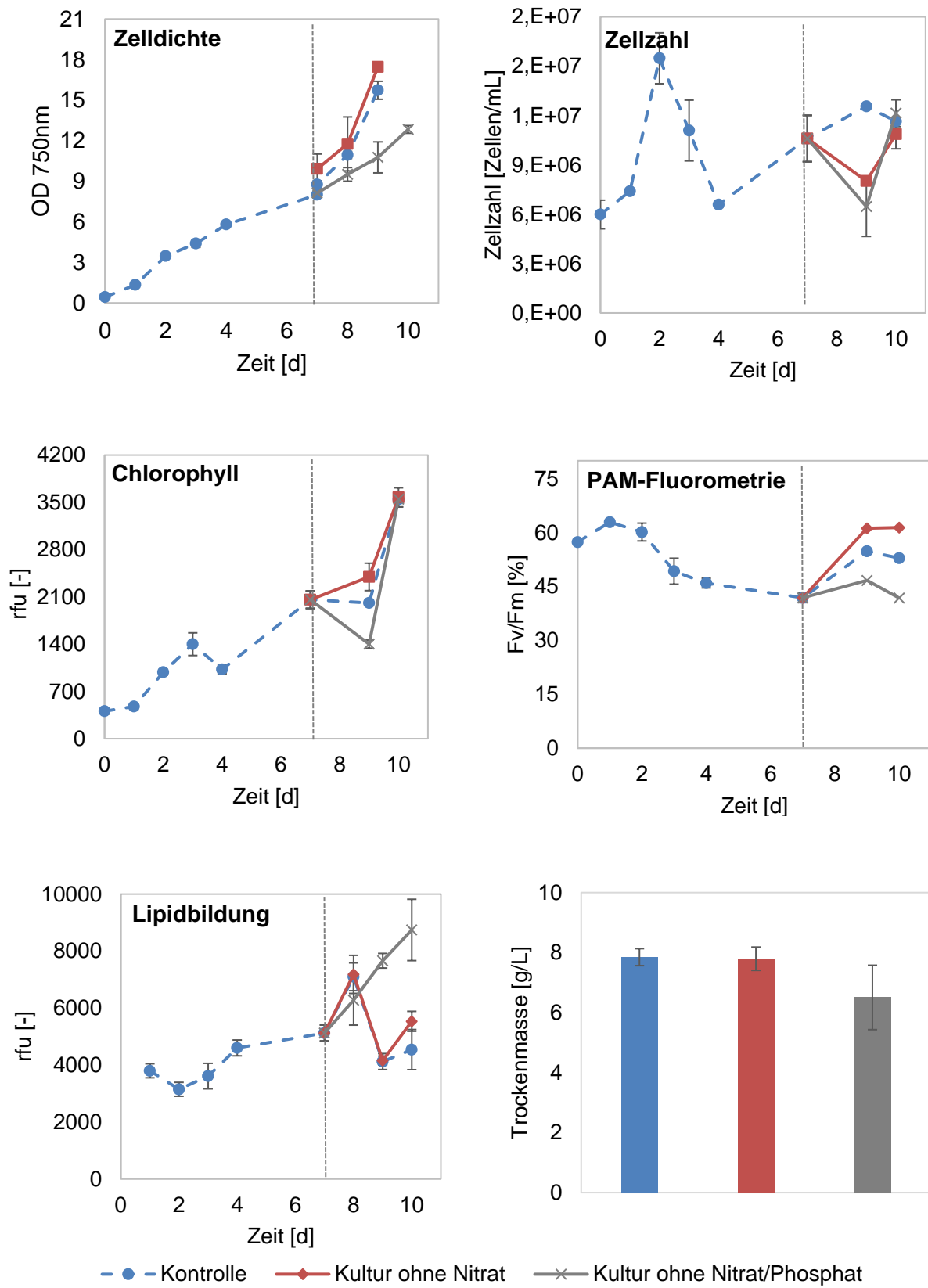


Abb. 16: Biomonitoring während der zweiphasigen Kultivierung von *S. acuminatus* in Papierfabriksabwasser. rfu: relative fluorescence units.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kultivierung der Mikroalgen in zwei Phasen ohne besondere Schwierigkeiten umsetzbar war. Auffällig war allerdings die absinkende Photosyntheseaktivität während der ersten Phase. Welche Faktoren die Ursache hierfür waren, konnte nicht abschließend geklärt werden. Wichtigster Befund war die vielversprechende Steigerung der Lipidfluoreszenz, der für die Versuche im Technikumsmaßstab eingesetzt werden sollte. Hervorzuheben ist dabei, dass die Kombination aus Nitrat und Phosphat auch in Bezug auf die spätere Freisetzung des Restwassers sinnvoll wäre.

Detoxifizierung

Neben der Biomasseproduktion ist die Aufreinigung des Abwassers in Phase 1 des Kultivierungsprozesses am wichtigsten. Aus der Literatur ist bekannt, dass Mikroalgen nicht nur über die bereits beschriebenen Kompetenzen zum Abbau bestimmter östrogen wirkender Stoffe verfügen, sondern auch zur Senkung des CSB-Wertes und der AOX-Fracht beitragen können (Tarlan et al., 2002, Usha et al., 2016).

Die allgemeinen Abwasserparameter (chem. Analytik) wurden vor und nach der Algenkultivierung verglichen, um die Reinigungsleistung der ausgewählten Algen zu überprüfen. Die geplanten Untersuchungen zur endokrinen Wirkung mit dem Hefetest waren allerdings nicht möglich (s. AP 2, Substanzkonzentrationen zu niedrig).

In Tab. 9 sind die Messergebnisse für drei der Mikroalgenstämme aufgelistet. Zu beachten ist, dass Nitrat und Phosphat zu Beginn der Kultivierung zugegeben wurde, um das Algenwachstum zu ermöglichen. Die Nährstoffkonzentrationen im nativen Abwasser der Nachklärung sind in der Regel hierzu nicht ausreichend.

Bis auf den CSB-Wert konnten alle Messparameter der chemischen Analytik durch die Algenbehandlung erfolgreich gesenkt werden. Von keinem dieser Parameter war von einem Konflikt mit der Abwasserverordnung zur Freisetzung in natürliche Gewässer auszugehen.

Bezüglich des CSB-Wertes wurde festgestellt, dass dieser nach der Algenkultivierung nicht wie erwartet gesunken war, sondern stets höher war als in der eingesetzten, nativen Abwasserprobe. Dies trifft auch für die Kontrolluntersuchungen ohne Abwasserzugabe zu. Zur Aufklärung dieses ungünstigen Befundes wurde entschieden, eine zusätzliche Versuchsreihe in AP 4 durchzuführen.

Tab. 9: Nährstoffkonzentrationen und AOX im Abwasser nach 7 Tagen Algenkultivierung.

	CSB schwarzb. [mg/L]	pH	N_{gesamt} Originalp. [mg/L]	NH₄ – N 0,45 µm filt. [mg/L]	NO₃⁻ – N 0,45 µm filt. [mg/L]	o-PO₄ – P 0,45 µm filt. [mg/L]	AOX [µg/L]
Abwasser bei Probenahme	216	7,9	6,7	0,22	1,4	0,36	181
<i>C. vulgaris</i> Kontrolle	474	7,9	133	0,77	126	0,16	n.b.
<i>C. vulgaris</i> Abwasser	444	8,5	41	< 0,01	32,3	0,17	155
<i>C. oleofaciens</i> Kontrolle	493	7,9	145	0,06	108	0,22	n.b.
<i>C. oleofaciens</i> Abwasser	503	8,4	41	< 0,01	29,5	0,20	165
<i>S. acuminatus</i> Kontrolle	488	7,9	144	0,47	118	0,24	n.b.
<i>S. acuminatus</i> Abwasser	426	8,7	47	< 0,01	35,7	0,23	299*

* Störung durch sehr hohe Chlorid-Gehalte möglich

3.3.3 Zusammenfassung AP 3

Nach Optimierung der Lichtintensität, der CO₂-Zufuhr und des Abwasseranteils konnten die Versuchsbedingungen standardisiert werden. Die jeweils besten Ergebnisse sind in Tab. 10 zusammengefasst. Es konnten im Vergleich zur Literatur hohe Trockenmasseausbeuten gewonnen werden, wobei mit der Mikroalge *S. acuminatus* die höchste Produktivität erzielt wurde. Die zweiphasige Kultivierung war insgesamt gut umsetzbar und lieferte wichtige Ergebnisse für die Planung der Versuche im Technikumsmaßstab.

Bedeutsamster Befund in diesem Kapitel war die unerwartete Feststellung des erhöhten CSB-Wertes nach der Algenkultivierung. Die Aufklärung hierzu sollte in AP 4 in einer zusätzlichen Versuchsreihe erfolgen.

Tab. 10: Zusammenfassung zur zweistufigen Kultivierung in Papierfabriksabwasser.

	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Chlorococcum oleofaciens</i>	<i>Scenedesmus acuminatus</i>
Lichtintensität [µmol/m²s]	100-400		
CO₂-Begasung [%]	2-8		
Max. Trockenmasse [g/L]	5,0	5,9	8,8
Limitierungsart Phase 2	Nitrat	Nitrat	Nitrat/Phosphat

3.4 Arbeitspaket 4: Untersuchung des Wachstums der Mikroalgen im Labormaßstab und Bewertung der Clearance-Kapazität

Schwerpunkt der Untersuchungen in AP 4 war die Entfernung von EDC's durch Mikroalgen. Zusätzlich musste nach Ergebnissen aus AP 3 der Verlauf des CSB-Wertes während der Algenbehandlung geprüft werden. In Vorbereitung auf AP 5 erfolgten erste Versuche zum Zellaufschluss.

3.4.1 CSB-Wert

Der CSB-Wert ist einer der wichtigen Parameter im Abwasser von Papierfabriken, da er ein Maß für die Beladung des Wassers mit organischen Verbindungen und damit auch die Größenordnung einer möglichen Sauerstoffzehrung dieser Verbindungen im Oberflächengewässer darstellt. Ziel der Abwasserreinigung in der Papierherstellung ist insbesondere, die Fracht an organischen Stoffen im Abwasser durch mehrstufige biologische Abwasserreinigung zu reduzieren.

Nachdem bei den ersten orientierenden Untersuchungen zu den Abwasserparametern nach 7 Tagen Algenkultivierung überraschend ein CSB-Anstieg zu verzeichnen war, wurden systematisch bei den folgenden Algenkultivierungen täglich Proben für CSB-Bestimmung (Küvettentests) entnommen. Die Ergebnisse sind Abb. 17 zu entnehmen.

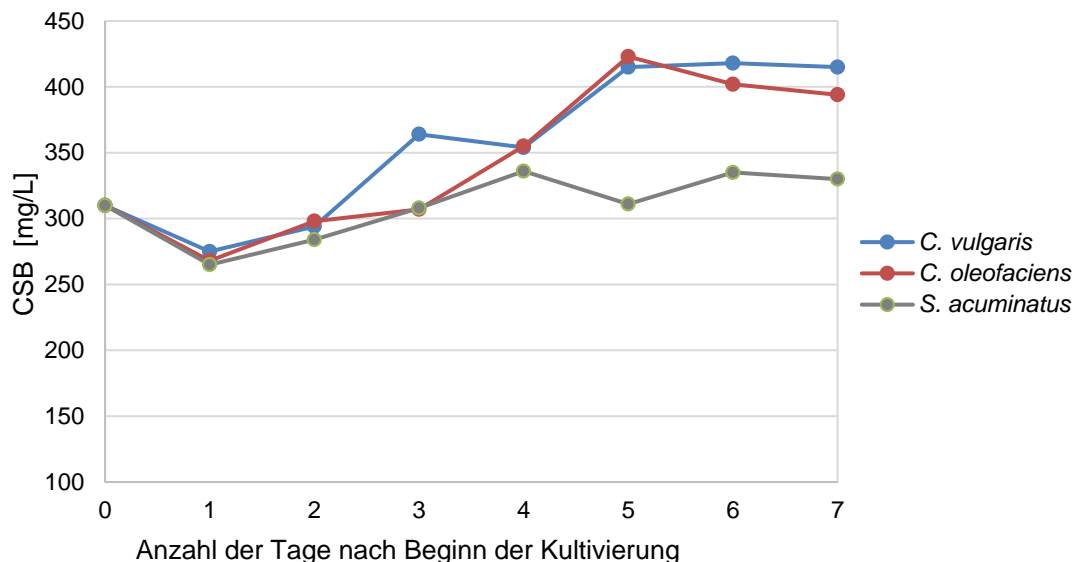


Abb. 17: Verlauf des CSB-Wertes in den Abwasserproben in den 7 Tagen der Algenkultivierung im Labormaßstab

Während sich *S. acuminatus* bei einem CSB-Wert von ca. 340 mg/L nach 6...7 Tagen einpendelt, ist die Erhöhung bei *C. vulgaris* (ca. 420 mg/L) und *C. oleofaciens* (ca. 400 mg/L) sogar noch stärker.

Die Untersuchung mit den drei verschiedenen Algenstämmen wurden parallel mit der gleichen Abwasserprobe durchgeführt, um Matrixeinflüsse durch unterschiedliche Abwasserzusammensetzung ausschließen zu können. Das Abwasser hatte vor Beginn der Algenkultivierung einen CSB-Wert von ca. 310 mg/L. Wie aus Abb. 17 erkenntlich, sank der CSB-Wert während der Assimilation der Mikroalgen an das Abwasser am Tag 1 um ca. 10 %. Zwischen Tag 1 und Tag 2 begann der CSB-Wert aber wieder zu steigen, so dass bereits nach 2 Tagen der ursprüngliche CSB-Wert nahezu wieder erreicht wurde. Ab Tag 3 ist die CSB-Konzentration bei allen Proben über dem Niveau des Testansatzes und steigt weiter an.

Um dieses Phänomen erklären zu können, wurde zunächst auf die CO₂-Zugabe in der Begasungsluft verzichtet. Es wurde vermutet, dass zu viel CO₂ als konkurrierende Kohlenstoffquelle dazu führt, dass der CSB-Abbau nicht so effektiv verläuft. Abb. 18 zeigt den ermittelten CSB-Verlauf unter diesen Bedingungen.

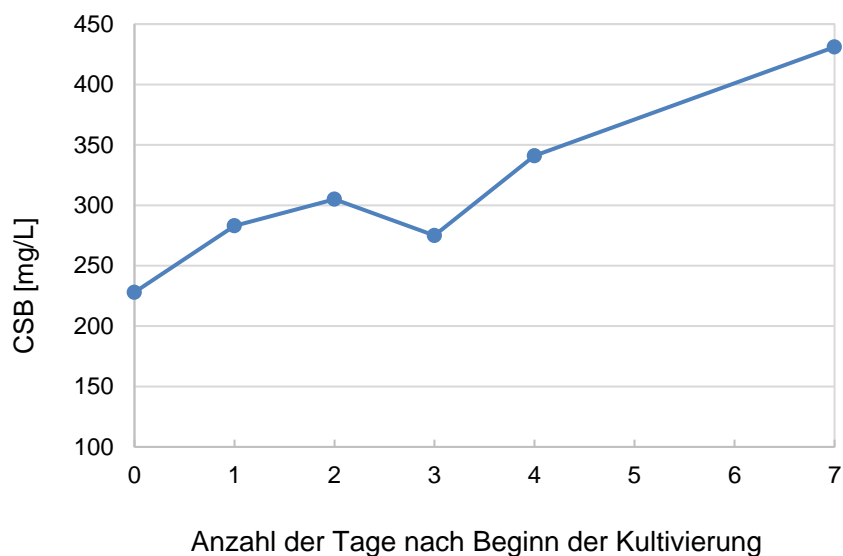


Abb. 18: Verlauf des CSB-Wertes ohne zusätzliche CO₂-Zugabe während der Algenkultivierung (*S. acuminatus*).

Wie erkennbar ist, steigt der CSB-Gehalt auch in dieser Probe sehr stark an. Es wird vermutet, dass während der Algenkultivierung im Abwasser durch den Stoffwechsel der Alge extrazelluläre Stoffe entstehen, die zu den höheren CSB-Konzentrationen

führen. In der Literatur werden die Sekretion von organischem Material im Rahmen der CO₂-Fixierung, aber auch abgestorbene Algenzellen dafür verantwortlich gemacht (Lee et al., 2019). Außerdem wurde beobachtet, dass das Abwasser mit zunehmender Kultivierungsdauer trüber wurde. Möglicherweise entstehen also partikuläre Stoffe, die höhere Molmassen aufweisen. Im Labor wurde daher der CSB-Wert im Folgenden in den stufenweise enger filtrierten Abwasserproben (am Tag 7) gemessen. Die Resultate sind in Tab. 11 zusammengefasst.

Tab. 11: CSB-Wert im Abwasser in 7 Tagen Algenkultivierung (*S. acuminatus*).

Probenbezeichnung	CSB (Mittelwert aus Doppelbestimmung) [mg/L]
Vorkultur	146
Tag 0 *	228
Tag 1 *	283
Tag 2 *	305
Tag 3 *	275
Tag 4 *	341
Tag 7 * Originalprobe	431
Tag 7 schwarzbandfiltriert	435
Tag 7 0,45 µm filtriert	324
Tag 7 Zentrifugat 1000 rpm	310
Tag 7 Zentrifugat 2000 rpm	235
Tag 7 Zentrifugat 4500 rpm	171

* In der Originalprobe gemessen.

Den Ergebnissen ist zu entnehmen, dass nach der 0,45 µm-Membranfiltration und mit steigender Drehzahl beim Zentrifugieren der CSB-Wert in der Abwasserprobe deutlich geringer wird. Offensichtlich wird der steigende CSB bei der Algenkultivierung zu großen Anteilen von partikulären Stoffen gebildet, der CSB durch echt gelöste organische Stoffe scheint im Vergleich dazu deutlich geringer zu sein. In den folgenden Versuchen wurde untersucht, ob der steigende CSB-Wert während der Algenkultivierung auch beim Upscaling in die größeren Reaktoren auftritt.

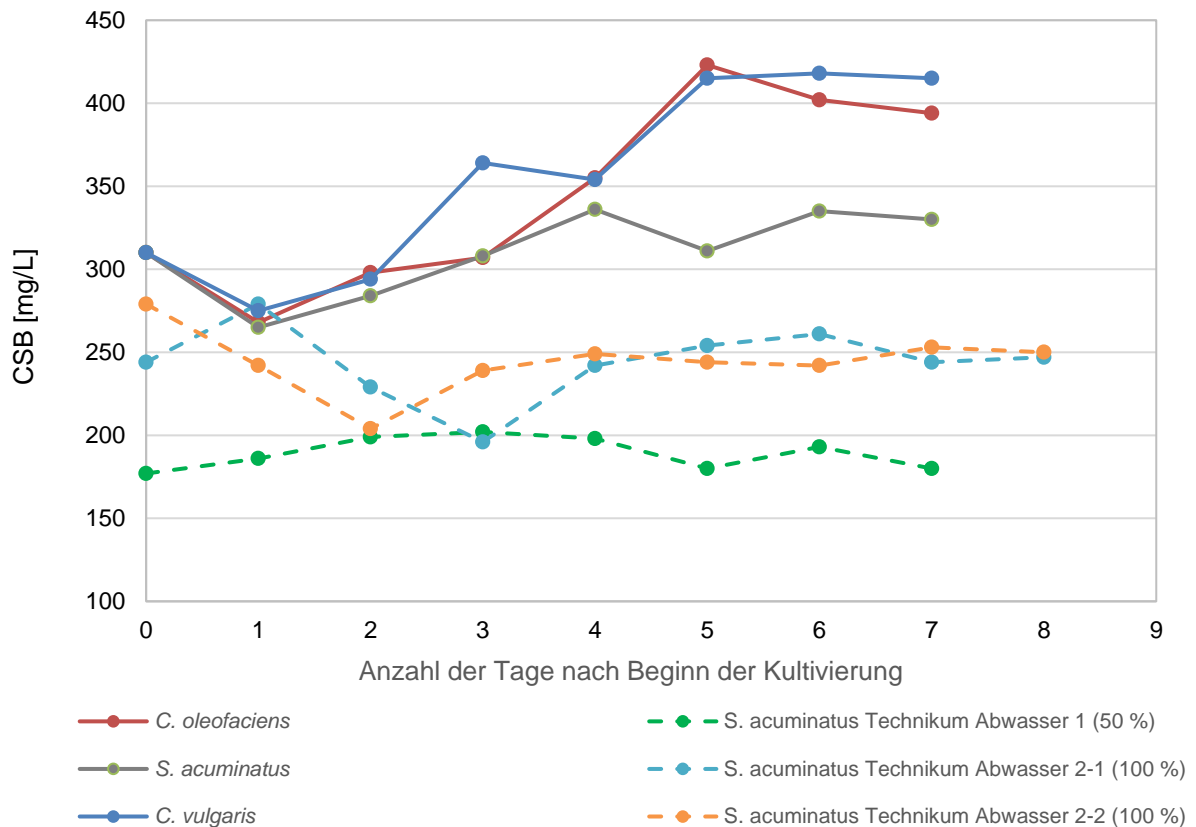


Abb. 19: Verlauf des CSB-Wertes in den Abwasserproben während 7-tägiger Algenkultivierung im Labor- und im Technikumsmaßstab.

In Abb. 19 sind die Verläufe des CSB-Wertes im Labormaßstab (obere drei durchgezogene Linien, alle drei untersuchten Algenstämme) und im Technikumsmaßstab (untere drei gestrichelte Linien, unterschiedliche Abwasserproben, alle Untersuchungen mit *S. acuminatus*) dargestellt. Während bei den Proben im Labormaßstab signifikante Erhöhungen des CSB-Gehaltes in den 7 Tagen Algenkultivierung auftreten, sind die CSB-Gehalte in den 6 L-Algenreaktoren im Technikum deutlich stabiler und liegen nach 7 Tagen auf dem gleichen Niveau wie zu Beginn der Algenkultivierung. Die Untersuchungen mit dem Abwasser 2 wurden im Technikumsmaßstab parallel in zwei verschiedenen, aber baugleichen, 6 L-Reaktoren durchgeführt (blaue bzw. orangefarbene gestrichelte Linie) und zeigen eine gute Übereinstimmung im CSB-Verlauf.

Als Grund für das unterschiedliche Verhalten wird die deutlich höhere Zelldichte in den Laborreaktoren im Vergleich zu den Technikumsreaktoren angesehen. Insofern ist die CSB-Erhöhung im praktischen Anlagenbetrieb möglicherweise kein schwerwiegendes Problem, erfordert aber weitere Untersuchungen. Die prinzipielle Eignung von

Mikroalgen zur CSB-Reduzierung im Abwasser ist gegeben. In Tab. 12 sind die Ergebnisse einer zusätzlichen Literaturrecherche zum Thema CSB-Reduzierung bei der Algenkultivierung im Abwasser zusammengefasst. In den meisten Fällen konnte eine Reduktion von über 50 % erzielt werden. Allerdings ist in einigen Veröffentlichungen das untersuchte Kulturmedium auch nicht eindeutig zuzuordnen, in einigen Untersuchungen erfolgte die Algenkultivierung im Abwasser der ersten Reinigungsstufe, teilweise mit Zusatz der leicht abbaubaren Glukose, oder in Abwässern mit sehr hohen CSB-Gehalten, bei denen der Abbau der organischen Stoffe im Abwasser einer möglichen Bildung von sauerstoffzehrenden Stoffen durch den Stoffwechsel der Algen deutlich dominiert.

Tab. 12: Übersicht zur CSB-Entfernung mit verschiedenen Algenstämmen aus der Literatur. Zusätzlich wurden Stickstoff- und Phosphor-Elimination aufgeführt (Nagi et al., 2020).

	Culture medium	Nutrients initial mg.L⁻¹	Nutrients removal [%]	Biomass
<i>C. vulgaris</i>	Primary wastewater + glucose	COD: 422.4 N-NH ₄ ⁺ :28.9 P-PO ₄ ³⁻ :3.2	COD: 67 N-NH ₄ ⁺ :100 P-PO ₄ ³⁻ :97	0.419
<i>Scenedesmus abundans</i> & <i>C. pyrenoidosa</i>	rice mill effluent	COD: 1600 N-NH ₄ ⁺ :154 P-PO ₄ ³⁻ :360	N-NH ₄ ⁺ : 92 & 90.3 P-PO ₄ ³⁻ :98.3 & 97.6	N.A
<i>Scenedesmus</i> sp.	anaerobic digestion of dairy cattle manure	NH ₄ ⁺ -N:113	N.A	N.A
<i>Scenedesmus</i> sp.	biogas and digested carbon source	COD:5000	COD: 69.1	1.8
<i>Scenedesmus</i> sp.	60% TWW	COD: 2447 N-NH ₄ ⁺ :208 P-PO ₄ ³⁻ :3.96	COD: 57.46 N-NH ₄ ⁺ :60.5 P-PO ₄ ³⁻ :89.50	0.6
<i>C. vulgaris</i>	treated urban wastewater	N-NH ₄ ⁺ :226 P-PO ₄ ³⁻ :143.5	N-NH ₄ ⁺ : 26.5	1.2
<i>Scenedesmus</i> sp.	50% TWW	P-PO ₄ ³⁻ :13.23	P-PO ₄ ³⁻ :99.85	0.6
<i>C. minutissima</i> & <i>Scenedesmus</i> sp.	primary treated wastewater	COD: 149.75 N-NH ₄ ⁺ :39.5 P-PO ₄ ³⁻ : 3.68	COD: 81 N-NH ₄ ⁺ :88.5, 92 P-PO ₄ ³⁻ :85	0.45 & 0.44
<i>C. sorokiniana</i>	palm oil mill effluent	COD: 580 N-NH ₄ ⁺ :85.8 P-PO ₄ ³⁻ : 20.5	N-NH ₄ ⁺ :93.36 P-PO ₄ ³⁻ :94.50	1.2
<i>C. sorokiniana</i> & <i>Scenedesmus</i> sp.	100% raw sewage	COD: 320 N-NH ₄ ⁺ :52.23 P-PO ₄ ³⁻ :8.47	COD: 69.38, 76.13 N-NH ₄ ⁺ : 86.93,98.54 P-PO ₄ ³⁻ : 68.24, 98	1.31 & 1.06
<i>Scenedesmus</i> sp.	starch containing textile	COD: 3800	COD: 71	1.4
<i>Acutodesmus obliquus</i> & <i>Parachlorella kessleri</i>	10% anaerobic digestion effluent	N.A	COD: 45.4, 39.1 N-NH ₄ ⁺ : 7.87, 15.3 P-PO ₄ ³⁻ : 84, 84.2	1.1 & 1

<i>Scenedesmus</i> sp.	molasses and grass wastewater anaerobic digested effluents	N-NH ₄ ⁺ :159 P-PO ₄ ³⁻ :16.71	N.A	3.2
<i>Scenedesmus obliquus</i> & <i>Desmodesmus</i> spp.	land fill leachate and urban wastewater	COD: 465 N- NH ₄ ⁺ :150 P-PO ₄ ³⁻ : 20	COD: 64, 67 N-NH ₄ ⁺ : 79, 82 P-PO ₄ ³⁻ : 43, 41	1.2 &1.3

Mindestens vier Publikationen berichten ebenfalls über einen Anstieg des CSB-Wertes im Rahmen der Abwasserbehandlung mit Mikroalgen (Arbib et al., 2013, García-Galán et al., 2018, Uggetti et al., 2018). Ausführlich wurde die Problematik in der Publikation von (Lee et al., 2019) diskutiert. Der signifikante Anstieg war hier drei Tage nach Beginn der Algenbehandlung aufgetreten. Erfolgreich verhindert werden konnte die Problematik durch Zugabe von Belebtschlamm. Es handelt sich somit bei den Algensekreten um biologisch abbaubare Substanzen, die bei Projektrealisierung leicht entfernbar sein sollten. Im geplanten Folgeprojekt soll dieses Thema genauer untersucht werden.

3.4.2 Abbau endokrin wirkender Einzelstoffe

Endokrin wirkende Substanzen werden mit konventionellen biologischen Reinigungsverfahren nur unvollständig aus Abwässern entfernt. Als weiterführende Maßnahmen werden *advanced oxidation processes*. Nanofiltration, Adsorption mittels Aktivkohle oder Photokatalyse vorgeschlagen. Die Mikroalgen-basierte Elimination der schwer abbaubaren Stoffe ist eine Alternative, die aus ökonomischen und umweltbezogenen Gründen bevorzugt angestrebt werden soll (Roccuzzo et al., 2021). Aus Studien zur Abbaukapazität bestimmter Einzelstoffe ist bekannt, dass diese für unterschiedliche Mikroalgenstämme variieren. In Tab. 13 sind sämtliche Untersuchungsergebnisse der letzten Jahrzehnte zum Abbau von Bisphenol A mit verschiedenen Mikroalgen aufgelistet. Die Zusammenstellung verdeutlicht, dass auch die Substanzkonzentration relevant ist. Ziel dieses Arbeitspaketes war es, die Abbau-Kapazitäten der Algenstämme für zwei Leitsubstanzen (Bisphenol A, Nonylphenol) zu vergleichen. Diese Substanzen können bei der Papierherstellung zum Einsatz kommen und so in das Abwasser eingetragen werden. Wichtig ist, dass die Substanzen bereits in Rohabwasser, aber auch in biologisch gereinigtem Abwasser nachgewiesen wurden (Balabanič, Krivograd Klemenčič, 2011, Kersten, 2009b).

Tab. 13: Literaturergebnisse zum Mikroalgen-basierten Abbau von Bisphenol A bzw. Ersatzstoffe.

Mikroalgen-Spezies	Substanzkonzentration	Abbau-Effizienz	Referenz
<i>Chlorella vulgaris</i>	20 mg/L	100 %	Gulnaz, Dincer (2009)
<i>Chlorella fusca</i>	9 mg/L	90 %	Hirooka (2005)
<i>Monoraphidium braunii</i>	4 mg/L	48 %	(Gattullo et al., 2012)
<i>Chlorella vulgaris</i>	2 mg/L (Bis F)	60 %	Peng (2009)
<i>Chlamydomonas</i> , <i>Chlorella vulgaris</i>	1 mg/L	23-24 %	Ji et al. (2014)
<i>Desmodesmus</i>	1 mg/L	57 %	Wang et al. (2017)
Mikroalgen-Mischung	10 µg/L	99 %	Abargues et al. (2013)
<i>Chlorella</i> , <i>Nitzschia</i>	10 µg/L	43 %	Sole, Matamoros (2016)
<i>Chlorella vulgaris</i>	1 µg/L	80 %	Skufca et al. (2021)

Die dazugehörigen Versuche wurden in zwei separate Untersuchungen aufgegliedert. Zuerst wurden die Algen in Modellabwasser (1 mg/L BPA) kultiviert. Danach wurden reale Abwasserproben mit gleicher Substanzkonzentration gespikelt. Hier sollte untersucht werden, ob in der Abwassermatrix gleiche Abbauergebnisse erzielt werden können oder ob ggf. Faktoren im Abwasser den Metabolismus der Algen beeinträchtigen. Die Durchführung erfolgte mit den beiden Stämmen *S. acuminatus* und *C. oleofaciens*, mit denen die höchste Trockenbiomasse-Ausbeute bei 90 % Abwasser erreicht wurde (s. AP 3, Abb. 15).

Versuchsdurchführung

Für die Versuche mit Modellabwasser wurde Algenkulturmedium (BG11) mit Bisphenol A bzw. Nonylphenol auf eine Konzentration von 1 mg/L eingestellt und mit Algenkulturen inokuliert. Der Versuch wurde mit 10 mL-Reaktoren im Reaktorsystem der Firma CellDeg durchgeführt. Die Algenkulturen wurden über sieben bis acht Tage mit CO₂ begast und mit LED-Lampen beleuchtet (Einstellung siehe AP 3, Tab. 7). Zur Evaluation des Substanzabbaus wurden täglich Proben gezogen, die Algen-Biomasse

abzentrifugiert und der Überstand bis zur Untersuchung mit dem rekombinanten Hefetest eingefroren.

Aus den Ergebnissen wurde die Mikroalge mit der höchsten Abbau-Kapazität ermittelt und für die Untersuchungen mit gespikten Abwasserproben weitergeführt. Die Abwasserproben (Papierfabrik A) wurden vor der Algen-Inokulation mit Nährstoffen des Kulturmediums BG11 angereichert, mit Bisphenol A gespikt (0,5 bzw. 1 mg/L) und anschließend unter identischen Versuchsbedingungen in 100 mL-Reaktoren inkubiert. Zur Validierung der Ergebnisse wurden diese Versuchsansätze zusätzlich nach Abschluss der Versuchszeit zu 400–500 mL gepoolt und mittels GC/MS analysiert. Als Kontrollen wurden in beiden Fällen zwei weitere Versuchsansätze mitgeführt: Ein Ansatz ohne Algenkulturen zur Berücksichtigung anderweitiger Faktoren auf den Substanzabbau und ein Ansatz mit Algenkulturen ohne Substanzzugabe zur Berücksichtigung von Wachstumshemmungen.

Ergebnisse Modellabwasser

In Abb. 20 ist beispielhaft der Abbau von Bisphenol A nach achttägiger Kultivierung in Modellabwasser mit *S. acuminatus* dargestellt.

Auf der linken Achse ist der Anstieg der Zelldichte aufgetragen. Das Wachstum der Algen verlief sowohl in der Kontrolle als auch in der behandelten Kultur exponentiell. Der Befund bestätigt, dass das Algenwachstum unabhängig von der Substanz-Beigabe war. Das Ergebnis des Hefetests ist auf der rechten Achse aufgetragen. Die Induktionsrate beschreibt die Stärke der östrogenen Wirkung. Der Substanzabbau erfolgte nicht gleichmäßig: An Tag 1 sank das Testsignal um $27 \pm 5 \%$, danach wurde erst an Tag 7 erneut eine signifikante Änderung von $78 \pm 1 \%$ gemessen.

Das Ergebnis verdeutlicht, dass eine Mindest-Inkubationszeit von sieben Tagen zur maximalen Abbaurate erforderlich war. Danach fand kein weiterer Abbau mehr statt.

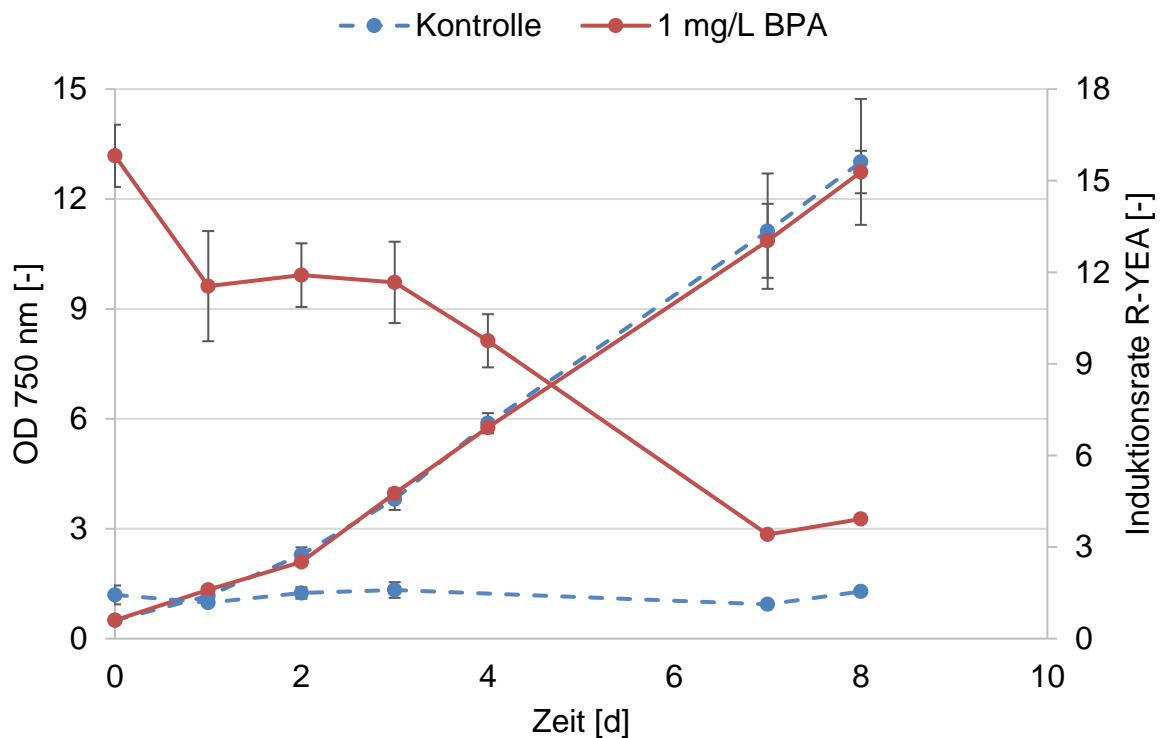


Abb. 20: Abbau von Bisphenol A mit *S. acuminatus*-Kulturen in Modellabwasser. Linke Ordinate: Zelldichte, rechte Ordinate: Endokrine Wirkung im Hefetest (R-YEA).

Die Induktionsrate an Tag 7 der Negativkontrolle (ohne Algenkulturen) war im Vergleich zu Tag 0 um 9 ± 5 % reduziert (Daten nicht gezeigt). Das Ergebnis befindet sich im Bereich von Literaturbefunden. Hier werden Messergebnisse zwischen 15 % und 16,2 % nach zehn bzw. 16 Tagen beschrieben. Als Ursache wird hauptsächlich Photodegradation angeführt (Ji et al., 2014, Li et al., 2009). Der Algen-Behandlung können somit 71 ± 4 % Abbauleistung zugeschrieben werden. Mit dem Algenstamm *C. oleofaciens* wurden im Vergleich dazu 52 ± 2 %¹ erreicht. Die Versuche mit Nonylphenol konnten nicht ausgewertet werden, da diese Substanz bei einer Konzentration von 1 mg/L kein Signal im R-YEA erzeugte.

Auf Grundlage der Ergebnisse wurden die Untersuchungen zum gespiktem Abwasser mit dem Algenstamm *S. acuminatus* weitergeführt.

¹ Für die Auswertung der Daten war es notwendig, die zur Signifikanz erforderliche Hefe-Zelldichte von 70 % auf 60 % gegenüber der Negativkontrolle herabzusetzen.

Ergebnisse gespiktes Abwasser

Für die Versuche mit gespiktem Abwasser fiel die Auswertung der endokrinen Wirkung als Summenparameter mit dem R-YEA weg (zytotoxisch, s. AP 2). Das Wachstum des Hefestamms wurde im Abwasser um bis zu 90 % gehemmt, sodass kein Ergebnis-Signal erzeugt werden konnte.

Eine weitere Komplikation ergab sich in Zusammenhang mit den Negativkontrollen: Die Inkubation im Photobioreaktor förderte das Wachstum nativer Algenkulturen aus dem Abwasser. So wurde nach 5–7 Tagen eine deutliche Kontamination mit verschiedenen Algenstämmen festgestellt. Der Anteil an abiotischen Faktoren auf den Substanzabbau war in dem Fall nicht direkt bestimmbar.

Die Ergebnisse zur Einzelstoffanalytik ergaben bei der Zugabe von 0,5 mg/L BPA Abbauleistungen von > 99 % (Doppelbestimmung, Werte nach Algenkultivierung < BG von 5 µg/L) und bei der Zugabe von 1 mg/L BPA zum Abwasser eine maximale BPA-Abbauleistung von 76 bzw. 82 %.

Zusammenfassung

Die Ergebnisse sämtlicher Untersuchungen zur Clearance sind in Tab. 14 zusammengefasst. Die Daten liegen im oberen Bereich von Literaturbefunden. Das beste Ergebnis wurde mit dem Algenstamm *S. acuminatus* im gespikten Abwasser erzielt. Aus Literaturbefunden ist bekannt, dass die Substanzen nicht nur in der Algenbiomasse akkumulieren, sondern eine Biodegradation stattfindet (Ding et al., 2020, Ji et al., 2014, Peng et al., 2014). Das Ergebnis ist somit vielversprechend in Bezug auf die weiterführende Abwasserreinigung.

Tab. 14: Prozentuale Reduktion der Bisphenol A-Konzentration im umgebenden Medium nach sieben Tagen Algenkultivierung.

	Modellabwasser	Gespikte Abwasserproben
	R-YEA	Einzelstoffanalytik
<i>Chlorococcum oleofaciens</i>	- Zugabe von 1 mg/L BPA: 52 ± 2 %	-
<i>Scenedesmus acuminatus</i>	- Zugabe von 1mg/L BPA: 71 ± 4 %	- Zugabe von 0,5 mg/L BPA: > 99 % - Zugabe von 1 mg/L BPA: 76 % bzw. 82 %

3.4.3 Zellaufschluss Mikroalgen

Zur Gewinnung der Algenlipide sind mehrere Schritte erforderlich. Vor der üblicherweise angewendeten Extraktion mit Lösemitteln kann ein Zellaufschluss zum Aufbruch der Zellwand sinnvoll sein. Dieses Verfahren kann, je nach Algenstamm und Zusammensetzung der Zellwand, den Lipidertrag um den Faktor 3-4 steigern (Lee et al., 2012). In Vorbereitung auf die Lipidextraktion, die für AP 6 vorgesehen ist, wurden zwei mechanische Aufschlussmethoden (Hochdruckhomogenisator und Schwingmühle) getestet. Diese Methoden waren 2016 bei einem Mikroalgen-Projekt des Fraunhofer Instituts als am effektivsten neben vier weiteren ermittelt worden und könnten auch kontinuierlich bzw. im Technikumsmaßstab betrieben werden (Schmid-Staiger et al., 2016).

Hochdruckhomogenisator

Hochdruckhomogenisatoren wurden ursprünglich zur Homogenisierung von Flüssigkeiten eingesetzt, kommen jedoch zunehmend auch in Zellaufschlussmethoden zum Einsatz. Das Arbeitsprinzip basiert auf dem Aufbau eines hohen Druckes auf die Zellflüssigkeit, die anschließend durch ein Ventil umgelenkt und auf einen Prallkörper geschleudert wird. Scher-, Normal- und Dehnkräfte, Turbulenz und Kavitation sorgen für eine effiziente Zerstörung der Zellen. Variierbare Parameter sind der Homogenisierdruck und Anzahl der Zyklen (Chmiel, 2018).

Für die Untersuchung wurde ein Modell der Firma Avestin (EmulsiFlex®-C3) verwendet, das an FE2 zur Verfügung steht. Die Algensuspensionen wurden auf eine Konzentration von 10 % (w/v) eingestellt und bei unterschiedlichem Druck (500, 1000, 1500 bar) mit je zehn Zyklen aufgeschlossen. Zur Ermittlung des Aufschlussgrades wurden nach jedem Zyklus Proben gezogen und der Proteingehalt im Überstand nach Bradford bestimmt (Bradford, 1976).

In Abb. 21 ist das Ergebnis für die Mikroalge *C. oleofaciens* dargestellt. Nach vier Zyklen stellte sich bei 1500 bar bereits die maximale Proteinkonzentration ein, sodass von einem Komplettverschluss auszugehen ist. Mit den anderen beiden Algenstämmen wurden ähnliche Ergebnisse ermittelt (*C. vulgaris*: 1500 bar, neun Zyklen, *S. acuminatus*: 1500 bar, vier Zyklen).

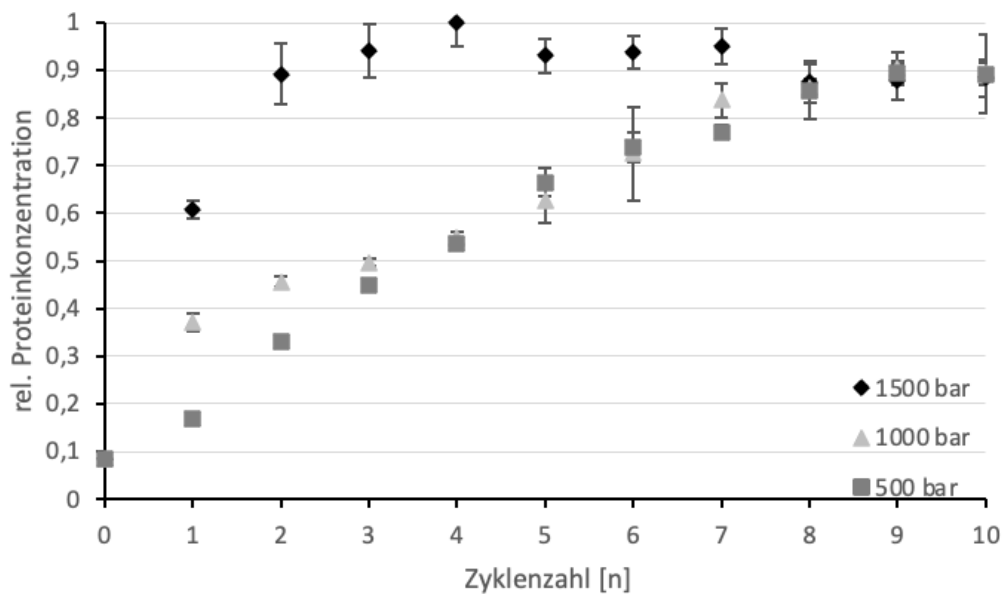


Abb. 21: Ergebnis des Zellaufschlusses mittels Hochdruckhomogenisator (Avestin, EmulsiFlex®-C3) für die Mikroalge *C. oleofaciens* bei unterschiedlichem Druck.

Schwingmühle

Bei der Schwingmühle werden Mahlkörper (Kugeln) und Zellsuspension in einem Hohlzylinder gegeben, der anschließend in Rotation versetzt wird. Die Mahlkörper prallen auf die Zellen und sorgen so für eine Zerstörung der Zellwand. An der FE2 steht eine Schwingmühle der Firma Retsch (MM 400) zur Verfügung, die mit Stahlkugeln ($\varnothing = 3 \text{ mm}$) oder Silicakugeln ($\varnothing = 0,5\text{-}0,75 \text{ mm}$) betrieben wird.

Für die Untersuchung des Zellaufschlusses wurden 20 mL Algensuspensionen auf eine Konzentration von 10 % (w/v) eingestellt und mit 145 g Stahlkugeln bzw. 12 g Silicakugeln in 50 mL Zentrifugenröhrchen gegeben und anschließend für 5 min bei 20 Hz aufgeschlossen. Um der Reibungswärme entgegenzuwirken, wurden die Zellen 10 min auf Eis gekühlt und danach zwei weitere Zyklen durchgeführt.

Die Proteinkonzentration im Überstand der Proben lag unter der maximalen Konzentration des Hochdruckhomogenisators (s. Abb. 22). Der Komplettaufschluss war somit über die Schwingmühle nicht erreichbar.

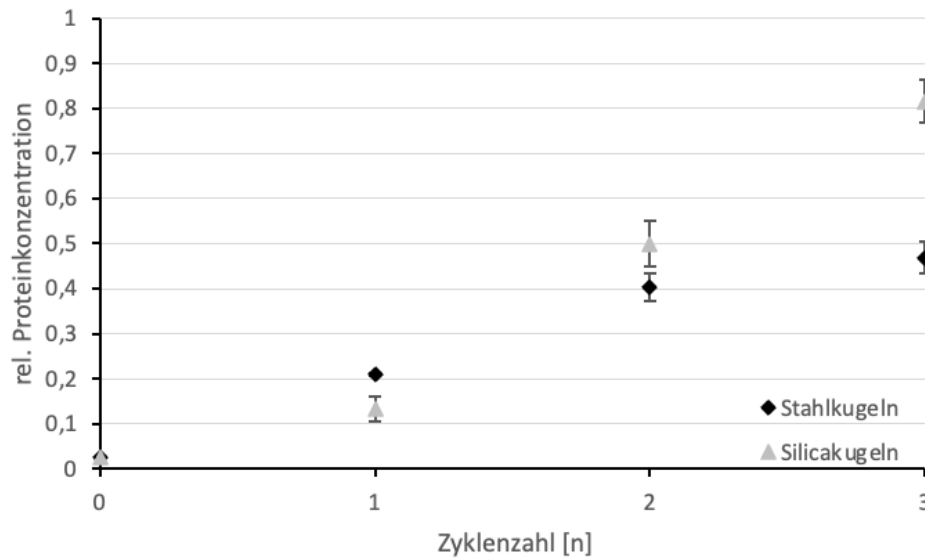


Abb. 22: Ergebnis des Zellaufschlusses mittels Schwingmühle (Retsch, MM 400) für die Mikroalge *C. oleofaciens* mit unterschiedlichem Mahlgut.

Für AP 5 wurde der Zellaufschluss jeweils mittels Hochdruckhomogenisator bei 1500 bar und der ermittelten erforderlichen Zykluszahl für alle Algenstämme durchgeführt.

3.4.4 Zusammenfassung AP 4

In AP 4 wurde die Detoxifizierungsleistung der verschiedenen Mikroalgenstämme anhand ausgewählter Problemstoffe verglichen. Die besten Ergebnisse wurden mit der Mikroalge *S. acuminatus* erzielt.

Außerdem war im vorangegangenen AP ein Anstieg der CSB-Werte nach der Algenkultivierung aufgefallen. Die Senkung der CO₂-Zufuhr führte nicht zu der gewünschten Zehrung der organischen Verbindungen. Festgestellt wurde jedoch, dass der CSB-Wert auf eine erhöhte Partikeldichte (z. B. abgestorbene Algenzellen) zurückzuführen ist. Da der Effekt im Technikumsmaßstab und bei geringerer Zelldichte nicht auftrat, ist das Problem bei weiterer Hochskalierung unwahrscheinlich.

Ein wichtiger Punkt für die Verarbeitung der Algen stellt der Aufschluss der Zellen dar. In Vorversuchen wurde die Aufschlusseffizienz mittels Hochdruckhomogenisator und Schwingmühle getestet. Der Aufschluss mit dem Hochdruckhomogenisator war besonders effizient.

3.5 Arbeitspaket 5: Untersuchung des Wachstums im Technikumsmaßstab und Bewertung der Clearance-Kapazität

In AP 5 wurden die Versuche in den Technikumsmaßstab hochskaliert. An der FE2 stehen dazu zwei 6-Liter-Algenreaktoren der Firma Subitec zur Verfügung. Im Fokus der Versuche stand die Übertragung des zweiphasigen Kultivierungsprozesses aus AP 3. Das größere Kulturvolumen ermöglichte ergänzende Untersuchungsmethoden: Es konnte ausreichend Biomasse für die Lipidextraktion gewonnen werden sowie genügend Probenmaterial für die Einzelstoffanalytik endokrin wirksamer Substanzen im nativen Abwasser. Das Upscaling ist wichtig, da es erste praxisrelevante Einschätzungen für eine Realisierung des Prozesses liefert.

Zur Planung der Versuche wurden die Ergebnisse aus dem Labormaßstab (AP 1-4) berücksichtigt und der Fokus weiter auf die beiden Algenstämme *C. oleofaciens* und *S. acuminatus* gelegt, die sich in den vorangegangenen Arbeitspaketen als besonders effizient erwiesen hatten.

In den folgenden Kapiteln werden zunächst die Reaktoren und die Algenkultivierung beschrieben, anschließend folgen die Ergebnisse zur Clearance.

3.5.1 Algenwachstum im Technikumsmaßstab

6L-Algenreaktoren

Bei den 6L-Algenreaktoren handelt es sich um Flachplatten-Photobioreaktoren der Firma Subitec, die nach dem Prinzip eines Airlift-Reaktors arbeiten. Die Durchmischung der Kulturen wird ausschließlich über die Begasungsmembran am Boden des Reaktors gewährleistet. Statische Mischer teilen den Reaktor in übereinanderliegende Kammern, die von den Algenkulturen kontinuierlich durchströmt werden. Die Reaktoren sind mit einer Temperatur- und pH-Sonde ausgestattet, Temperierung mittels Wasserbad und CO₂-Begasungsrate sind regelbar (Abb. 23).

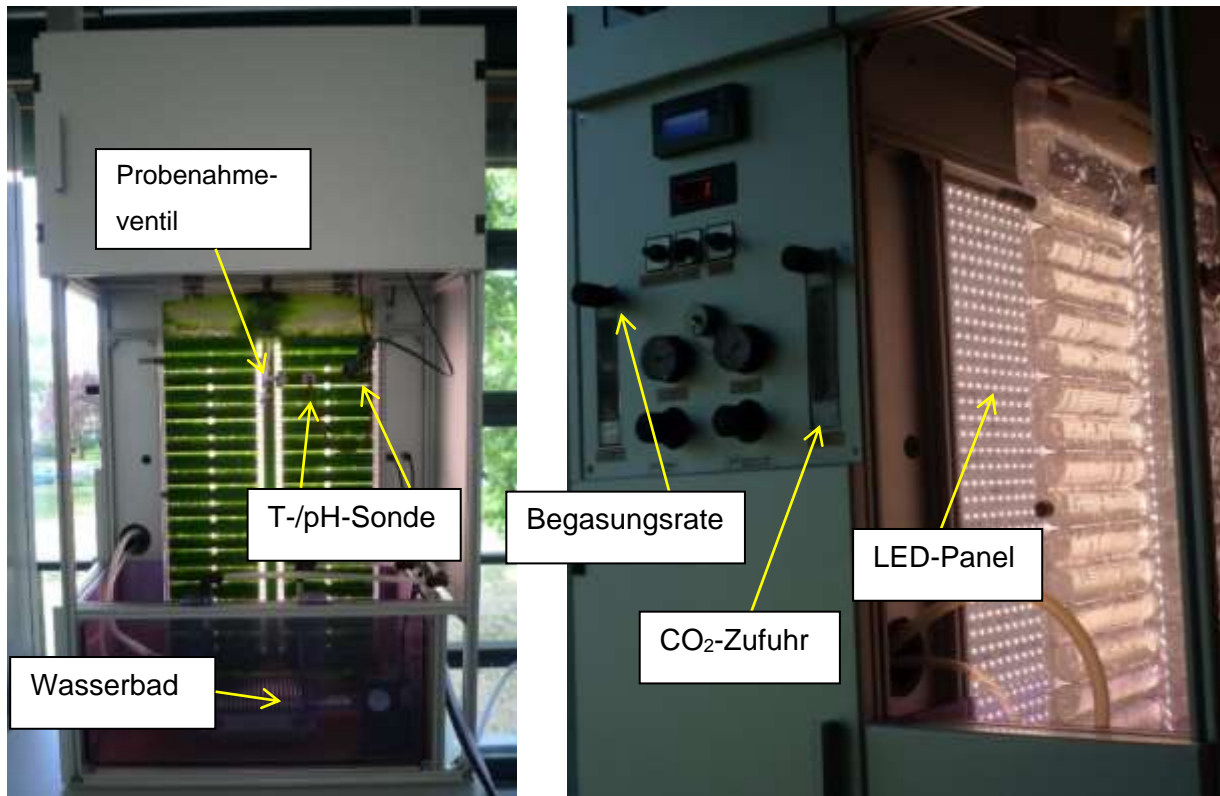


Abb. 23: Algenreaktoren (6 Liter Arbeitsvolumen) der Firma Subitec nach Aufrüstung mit LED-Panels.

Optimierung der Reaktorbeleuchtung

Zur Beleuchtung der Algenkulturen war eine Aufrüstung der Reaktoren erforderlich. Die bis zu Projektbeginn verwendeten Hochdrucknatriumdampflampen waren ungeeignet, da sie extern vor den Reaktoren platziert wurden und eine stetige Wärmeentwicklung verursachten. Auf Anfrage wurde seitens des Herstellers eine Erweiterung mit LED-Panels vorgenommen (Abb. 23, rechts).

Die LEDs sind über Stufenregelung dimmbar und können somit an die Anforderungen verschiedener Mikroalgenstämme und Zelldichten angepasst werden. Zur Umrechnung der Stufenregelung in die gängige Messgröße für photosynthetisch aktive Strahlung (Photonenflussdichte), war die Anschaffung eines zusätzlichen Lichtmessgerätes zur Kalibration erforderlich. Das Gerät wurde auf Empfehlung der Firma CellDeg über die GOSSSEN Foto- und Lichtmesstechnik GmbH erworben (Spektrometer Modell: *Mavospec Base*).

Wie im Labormaßstab auch erfolgten die ersten Versuche bei niedrigen Lichtintensitäten. Anschließend wurde in Anlehnung an ein Forschungsprojekt des Fraunhofer Instituts eine optimierte Belichtungsstrategie erarbeitet (Schmid-Staiger et

al., 2016). Dabei wird die Lichtintensität unter Berücksichtigung der Zelldichte, des Reaktorvolumens und der angestrahlten Reaktorfläche berechnet:

$$I_{rel.} = \frac{A * I}{BM * V_R}$$

*I_{rel.}: relative Lichtverfügbarkeit, A: angestrahlte Reaktoroberfläche,
I: Photonenflussdichte, BM: Biomasse, V_R = Reaktorvolumen*

Versuchsdurchführung

Für die Kultivierung von Mikroalgen wurden die Reaktoren vollständig zusammengesetzt, gereinigt und sterilisiert. Die Zugabe des Algen-Inokulums, der Nährstofflösungen und dem Papierfabriksabwasser (aus Vorsichtsgründen zunächst anteilig mit 50 %) erfolgte mittels Schlauchpumpen.

Die Algen wurden bei 25 ± 3 °C und 2 % CO₂-Begasung kultiviert (Phase 1). Die Lichtintensität wurde in zwei Stufen erhöht bzw. nach Erarbeitung der Belichtungsstrategie (Formel s. o.) eingestellt.

Nach sieben Tagen wurde die Algenbiomasse mittels Zentrifugation geerntet, gewaschen und in einer zweiten Phase bei Nährstoffmangel weiterkultiviert. Der Kulturüberstand wurde an der FE 1 mittels Spurenstoffanalytik auf endokrin wirksame Substanzen untersucht. Nach der Ernte wurde die Biomasse gefriergetrocknet und analysiert (s. Tab. 16). Zur Bestimmung des Lipidgehaltes wurde eine Soxhlet-Extraktion durchgeführt (ausführliche Methodenbeschreibung s. AP 6). Die Bestimmung des Stärkegehaltes erfolgte mit Anthron. Dazu wurden 0,2 g Anthron in 100 mL eiskalter Schwefelsäure (0,2 % w/v) gelöst und die Lösung anschließend im Verhältnis 1:4 zu den Proben gegeben. Nach 15-minütiger Inkubation bei 95 °C im Thermoblock und 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion der Lösung bei 625 nm gemessen. Zur Kalibration wurde Stärke im Messbereich von 25-500 mg/L verwendet (Richards et al., 2020).

Der Proteingehalt wurde über die Bradford-Methode ermittelt. Zur Herstellung des Bradford-Reagenzes wurden 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 in 50 mL Ethanol gelöst und mit 100 mL Phosphorsäure vermischt. Die Lösung wurde mit VE-Wasser auf ein Volumen von 1000 mL aufgefüllt und durch einen Faltenfilter gegeben. Zur Messung wurden 10 µL Probe mit 200 µL Bradford-Reagenz in eine Mikrotiterplatte

gegeben und 5 min im Dunkeln bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde die Extinktion bei 525 nm gemessen. Zur Kalibration diente BSA im Messbereich von 20-200 µg/mL (Bradford, 1976).

Tab. 15: Übersicht zu den Versuchsbedingungen im Technikumsmaßstab.

	<i>C. oleofaciens</i>	<i>S. acuminatus</i>
Abwasseranteil [%]	50	50
Lichtintensität [µmol/m²s]	OD _{750nm} < 2: 109 OD _{750nm} > 2: 215	109-762 nach Berechnung s.o.
CO₂-Zufuhr [%]	2	2
Nährstoff-Zugabe	BG11	BG11
Nährstoff-Limitierung Phase 2	Nitrat	Nitrat/Phosphat

Tab. 16: Übersicht zur Biomasse-Analytik.

Parameter	Messmethode
Lipidgehalt	Soxhlet-Extraktion, Gravimetrie
Stärkegehalt	Anthron-Methode
Proteingehalt	Bradford-Methode

Ergebnisse (50 % Abwasseranteil)

Es gelang eine stabile Kultivierung der Mikroalgen *C. oleofaciens* und *S. acuminatus* in den 6L-Reaktoren über zwei Wochen. Mit beiden Mikroalgen konnten dichte Kulturen ohne Zellaggregate erzeugt werden (s. Abb. 24).

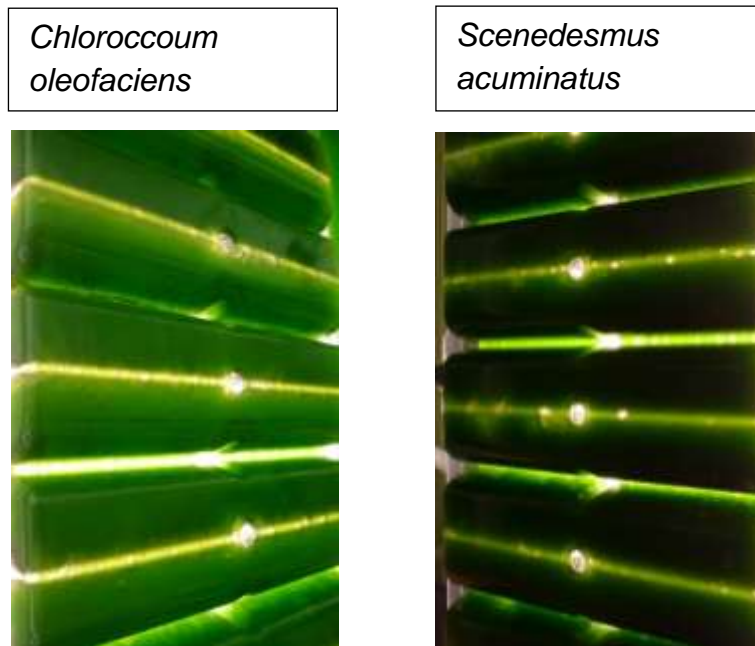


Abb. 24: Algenkulturen im 6L-Reaktor.

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 25 zusammengestellt. Erwartungsgemäß wurden mit der Mikroalge *S. acuminatus* höhere Biomasse-Ausbeuten erzielt als mit der Mikroalge *C. oleofaciens*. Die Produktivität war bei beiden Algen jedoch geringer als im Labormaßstab. Auffällig war die unterschiedliche Zusammensetzung der Biomasse. Bei *S. acuminatus* lag der Lipidgehalt nur bei 27,8 %, während mit *C. oleofaciens* fast das Doppelte erzielt wurde. Dafür war der Anteil an Stärke überraschend hoch. Offenbar bildet die Mikroalge *S. acuminatus* bevorzugt Stärke, während *C. oleofaciens* zur Lipidbildung tendiert. Unter Berücksichtigung der Biomassebildung lag die absolute Lipidausbeute von *S. acuminatus* mit 1,9 g/L dennoch leicht oberhalb von *C. oleofaciens* (1,5 g/L). Die Bestimmung des Proteingehaltes mit der Bradford-Methode lieferte auffällig niedrige Werte von max. 7 %. Die Methode wurde im späteren Verlauf des Projekts modifiziert, konnte aber auf die vorliegenden Proben nicht mehr angewendet werden. Es ist davon auszugehen, dass die restlichen Bestandteile hauptsächlich aus Protein bestanden.

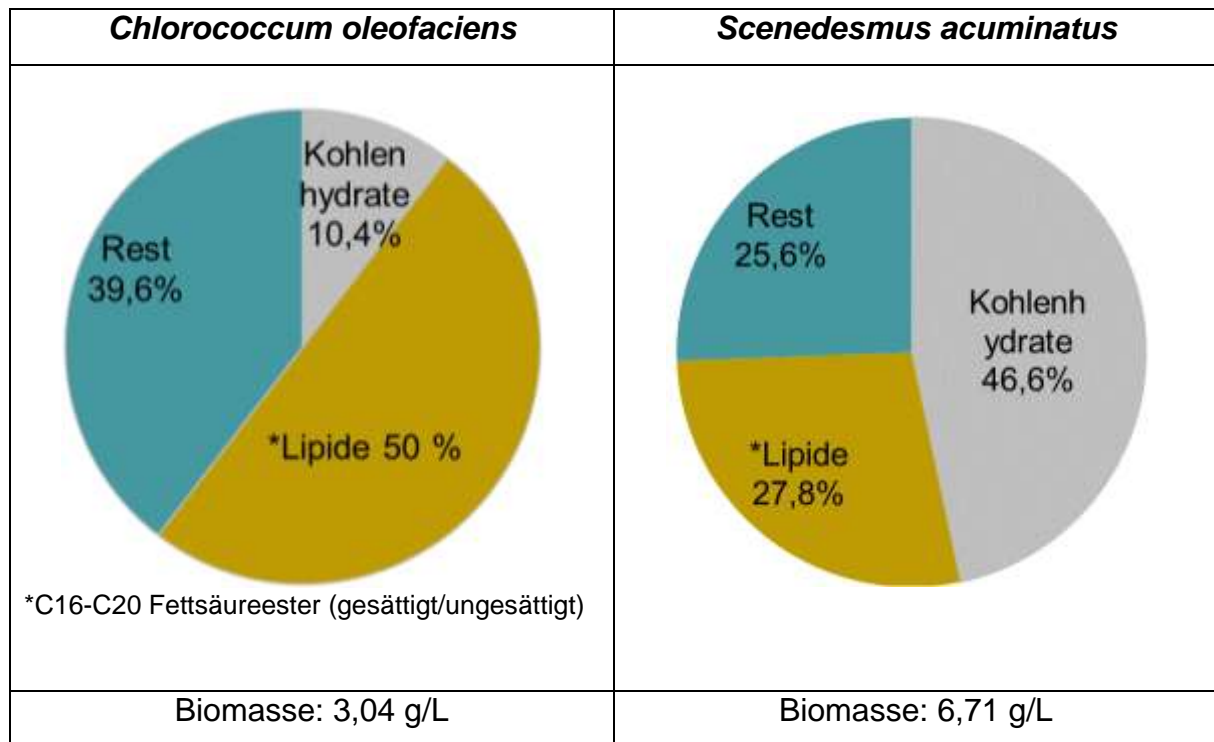


Abb. 25: Biomasse-Ausbeute und Zusammensetzung der Biomasse nach zweistufiger Kultivierung im Technikumsmaßstab in Abwasserproben der PF A.

In Bezug auf die Biodieselproduktion könnten auf Grundlage dieser Versuche die besten Ausbeuten mit der Mikroalge *S. acuminatus* erzielt werden. Die weitere Steigerung des Lipidgehalt könnte noch mit einer Reihe von alternativen Stressfaktoren getestet werden. In der Literatur liegt der Wert von knapp 30 % im Mittelfeld. 2018 wurden bei Nitratmangel mit *S. acuminatus* 54 % erzielt (Zhang et al., 2018), in einer Publikation von 2020 wurden ebenfalls bei Nitratmangel nur 17 % gewonnen (Rugnini et al., 2020).

Im Berichtszeitraum wurden erste Optimierungsversuche mit diesem Algenstamm durchgeführt:

- Erfolgreiche Kultivierung bei 100 % Abwasser statt 50 % (6,88 g/L Biomasse-Ausbeute)
- Erfolgreiche Kultivierung ohne aufwändige Vorfiltration des Abwassers
- Erhöhung der anfänglichen Phosphatzugabe aufgrund raschem Verbrauch

- Untersuchung alternativer Stressfaktoren zur Steigerung der Lipidbildung (Beleuchtung mit speziellen Licht-Wellenlängen s. 3.6.3, außerdem Sulfatmangel und höhere Lichtintensitäten)
- Erweiterung der Prozessführung von Batchbetrieb in (semi-)kontinuierlichen Betrieb

Die oben genannten Untersuchungen waren Vorversuche zu dem Antrag auf ein Folgeprojekt und sind in die Erstellung des Arbeitsprogrammes in diesem Antrag eingeflossen.

3.5.2 Bewertung der Clearance-Kapazität

Die Einzelstoffanalytik auf endokrine Substanzen und andere organische Spurenstoffe erfolgte mittels GC/MS nach Anreicherung der Analyten über Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) mittels Gerstel-Twister. Die Analysen wurden im gereinigten Abwasser der Papierfabrik A als Ausgangsmedium für die Algenkultivierung vorgenommen sowie in ausgewählten Versuchen nach der Algenkultivierung, um die Reduzierung der Einzelstoffe (Clearance-Kapazität) bewerten zu können. Im einzelnen wurden die in Tab. 17 genannten Stoffe analysiert.

Tab. 17: Übersicht Analyten Einzelstoffbestimmung mit Bestimmungsgrenzen

Stoffklasse	Einzelstoffe	Bestimmungsgrenzen
Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe	Naphthalin*, Acenaphthylen*, Acenaphthen*, Fluoren*, Phenanthren*, Anthracen**, Fluoranthen**, Pyren**, Benzo(a)anthracen**, Chrysen**, Benzo(b)fluoranthen**, Benzo(k)fluoranthen**, Benzo(a)pyren**, Indeno(1,2,3-cd)pyren**, Dibenzo(a,h)-anthracen**, Benzo(ghi)perylene**	*0,05 µg/L **0,01 µg/L
Phthalate	Dimethylphthalat (DMP)*, Diethylphthalat (DEP)*, Dipropylphthalat (DPrP)*, Diisopropylphthalat (DiPrP)*, Dibutylphthalat (DBP)*, Diisobutylphthalat (DiBP)*, Dipentylphthalat (DPP)*, Diisopentyl-phthalat (DiPP)*, Dihexylphthalat (DHxP)*, Dicyclohexylphthalat (DCHP)*, Di-n-heptylphthalat (DnHP)*, Di-n-octylphthalat (DnOP)*, Diethylhexylphthalat (DEHP)*, Di-n-nonylphthalat (DnNP)*, Diisononylphthalat (DiNP)***, Diisodecylphthalat (DiDP)***, Butylbenzylphthalat (BBzP)*	*0,5 µg/L **25 µg/L

Bisphenole	Bisphenol A	0,5; 1 oder 2 µg/L (matrix-abhängig)
------------	-------------	--------------------------------------

Das gereinigte Abwasser der Papierfabrik A wurde im Projektverlauf 5mal auf die o. g. Einzelstoffe untersucht. Die 16 Vertreter der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe wurden in keinem Fall in quantifizierbaren Konzentrationen gemessen. Von den Phthalaten wurden die in Tab. 18 genannten Verbindungen detektiert, wobei nicht in allen Proben die genannten Phthalate in bestimmbar Konzentrationen bestimmt werden konnten.

Tab. 18: Übersicht Analyten (Messwerte) - Einzelstoffbestimmung mit Bestimmungsgrenzen

Verbindung	Anzahl Messwerte oberhalb Bestimmungsgrenze (maximal 5)	Gemessener Konzentrationsbereich (µg/L)
Diethylphthalat DEP	3	0,8 – 2,0
Dibutylphthalat DBP	3	2,1 – 5,2
Diisobutylphthalat DiBP	3	1,3 – 3,5
Diethylhexylphthalat DEHP	2	0,5 – 2,0
Butylbenzylphthalat BBzP	3	0,8 – 1,2

Bisphenol A wurde in allen untersuchten Abwasserproben in der Nachklärung der PF A in Konzentrationen oberhalb der Bestimmungsgrenze gemessen, allerdings mit Werten von 1,0 bis 3,2 µg/L auf geringem Niveau. Zum Vergleich: Der Grenzwert für Bisphenol A im Trinkwasser beträgt nach TrinkwasserVO (2024) 2,5 µg/L. Für Phthalate gibt es aktuell keine Grenzwerte für Trinkwasser, allerdings für Oberflächengewässer. So beträgt z. B. der Grenzwert für DEHP nach Oberflächengewässer-VO als Jahresdurchschnittswert-Umweltqualitätsnorm (JD-UQN) 1,3 µg/L. Insofern liegen auch die geringen Konzentrationen, die im Abwasser gemessen worden sind, in umweltrelevanten Größenordnungen.

Für die Bewertung der Clearance-Kapazität wurden Proben nach der Algenkultivierung (7 Tage) des Abwassers der PF A mit *Scenedesmus acuminatus* (zwei verschiedene Kultivierungen) und *Chlorococcum oleofaciens* (eine Kultivierung) verwendet. Dabei

wurde das Abwasser für die Kultivierung auf 50 % verdünnt. Weder für Bisphenol A noch für die 5 in Tab. 18 genannten Phthalate wurden Messwerte oberhalb der Bestimmungsgrenze (0,5 bzw. 1,0 µg/L) ermittelt. Somit wurden alle untersuchten Einzelstoffe durch die Algenkultivierung auf Konzentrationen unterhalb der Bestimmungsgrenze reduziert. Auf die Angabe einer Reduktionsrate wird in diesem Fall verzichtet, da die Werte bereits in der nativen Abwasserprobe nah an der Bestimmungsgrenze des Messverfahrens lagen.

Wie aus den Messwerten für die Adsorbierbaren organischen Halogenverbindungen (AOX) in Tab. 9 ersichtlich, geht mit der Algenkultivierung auch eine Veränderung des AOX-Gehaltes einher. Aufgrund der wenigen Messwerte kann hier aber keine belastbare Aussage zur Clearance getroffen werden.

3.5.3 Zusammenfassung AP 5

In AP 5 wurden die Ergebnisse aus dem Labormaßstab in die erste Stufe des Technikumsmaßstab übertragen. Die Hochskalierung war erfolgreich, jedoch konnten die Biomasseausbeuten des Labormaßstabs noch nicht erreicht werden. Die besten Ergebnisse wurden mit dem Mikroalgenstamm *S. acuminatus* erzielt. Mit einem Kulturvolumen von 6 L könnten bis zu 6 g Algenöl/Woche bei gleichzeitiger Reinigung von Papierfabriksabwasser gewonnen werden. Im Berichtszeitraum wurden erste Optimierungsversuche mit diesem Algenstamm durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass mit der Algenkultivierung eine Reduzierung von endokrin wirksamen Stoffen einhergeht. Dies betrifft sowohl die im Abwasser gemessenen Einzelstoffe (Bisphenol A und Phthalate) als auch die summarische Wirkungsgröße im RYEA-Test, die auch das Vorhandensein weiterer, nicht einzeln messbarer östrogen wirksamer Stoffe (z.B. Lignane und andere Verbindungen aus Holzstoffen) widerspiegelt.

3.6 Arbeitspaket 6: Produktion von Lipiden aus Mikroalgen

Grundlage für die in diesem Arbeitspaket beschriebenen Untersuchungen sind die Arbeiten im Technikumsmaßstab, die in AP 5 beschrieben wurden. Im AP 6 liegt der Schwerpunkt auf der Auswertung der Untersuchungen zur Lipidbildung, der Extraktion der Lipide aus der Biomasse (Kap. 3.6.1) sowie der Analyse der Zusammensetzung

der von den verschiedenen Mikroalgenspezies produzierten Fettsäureestern (Kap. 3.6.2).

Anschließend wurden Optimierungsversuche zur Steigerung des Lipidgehaltes durchgeführt (Kap. 3.6.3).

3.6.1 Extraktion der Lipide aus der Biomasse

Die Extraktion der Biomasse nach Algenkultivierung, Zellaufschluss (siehe Kap. 3.4.3) und Gefriertrocknung erfolgte zunächst mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion. Die Ergebnisse der ersten Soxhlet-Extraktion waren im Vergleich zu Werten aus der Literatur (19-29 %) zunächst sehr niedrig (Lam, Lee, 2012, Panahi et al., 2019, Zheng et al., 2011). Mit dem Lösungsmittel n-Heptan und der Biomasse einer *C. vulgaris* Kultur, unter Standardbedingungen kultiviert, lagen die Werte für den Lipidgehalt zwischen 3,0 und 3,2 %. Durch die Einführung des zuvor diskutierten Zellaufschlusses konnte die Ausbeute der Extraktionen deutlich erhöht werden. Bei einer Probe von ebenfalls unter Standardbedingungen kultivierten *C. oleofaciens*, ergaben sich Werte, die sich um einen Faktor von 42,9 unterschieden. Die unaufgeschlossene Probe erzielte einen Massenanteil der eingesetzten Trockenmasse von 0,52 %, während die aufgeschlossene Probe derselben Algenkultur einen Wert von 22,3 % ergab. Die Extraktion mit zusätzlichem Aufschluss der Zellen zeigte sich somit in Bezug auf den gravimetrischen Wert der Extrakte als deutlich effizienter.

Um die Extraktion weiter zu optimieren, wurden der Einsatz verschiedener Extraktionsmittel in Betracht gezogen. Zunächst wurde dem bisher verwendeten n-Heptan ein Volumenanteil von 10 % Methanol zugesetzt. Durch das polare Lösungsmittel sollte die Extraktion von Lipidkomplexen, die innerhalb der Zelle membranassoziiert vorliegen, verbessert werden (Halim et al., 2012). Da zur Lipidextraktion aus Lebensmitteln meist n-Hexan als Extraktionsmittel genutzt wird, wurde auch dieses Lösungsmittel mit und ohne Zusatz von Methanol untersucht. Die Ergebnisse zeigten eine Steigerung bei n-Heptan mit Methanol Zusatz von 6,05 %. Mit n-Hexan wurde der Wert sogar um 10,15 % verbessert.

Durch den höher liegenden Absolutwert bei dem Einsatz des n-Hexan-Methanol-Gemisches wurden weitere Kombinationen des unpolaren n-Hexans mit stärker polaren Lösemitteln getestet. Außerdem liegt mit n-Hexan gegenüber n-Heptan ein

Lösungsmittel vor, welches Neutrallipide selektiver extrahiert (Guckert et al., 1988, Halim et al., 2011, Robles Medina et al., 1998). Es wurden, wie in der Literatur bereits zu finden, die Lösungsmittel Dichlormethan, Essigsäureethylester, Aceton und Isopropanol mit ebenfalls 10 % (v/v) verwendet (BLIGH, DYER, 1959, Cheng et al., 2011, Gouveia, Oliveira, 2009, Halim et al., 2012, Rayati et al., 2020, Ren et al., 2017). Zusätzlich sollte eine erhöhte Methanol-Konzentration von 20 % und 33,3 % (v/v) getestet werden. Die Ergebnisse der Extraktionsversuche sind in Abb. 26 zusammenfassend dargestellt.

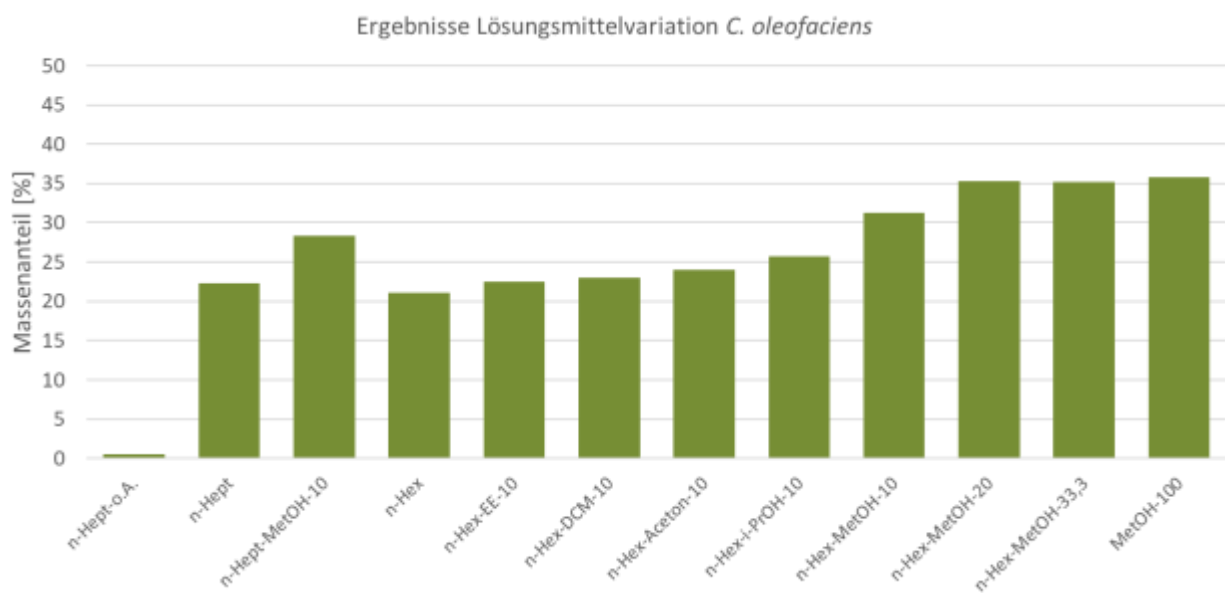


Abb. 26: Massenanteil an extrahierten Algenölen nach Soxhlet-Extraktion mit unterschiedlichen Lösemitteln (Balken links: Extraktion mit n-Heptan ohne Zellaufschluss, alle anderen mit Zellaufschluss) (Laubenstein, 2022).

Die höchste Extraktionsausbeute wurde mit ca. 35 % mit den verschiedenen n-Hexan/Methanol-Gemischen und reinem Methanol erreicht.

Für weitere Extraktionen wurde die Lösungsmittelkombination aus 80 % n-Hexan und 20 % (v/v) Methanol genutzt. Diese Kombination stellte mit einem Lipidgehalt von über 35 % eines der besten Ergebnisse dar, besaß jedoch einen höheren Anteil an n-Hexan als die anderen Gemische mit vergleichbaren Werten.

Nun wurden mittels Soxhlet-Extraktion weitere Proben der stickstofflimitierten Kultur der Alge *C. oleofaciens* extrahiert. Dabei konnten mehrfach Ausbeuten von bis zu 50 % ermittelt werden. Die Induktion der erhöhten Lipidakkumulation in den Zellen mittels Stickstoffmangel wurde somit erfolgreich eingesetzt.

Die *S. acuminatus* Kultur zeigte nach Aufschluss und Extraktion einen Massenanteil von 25,4 %. In der Literatur sind etwas niedrigere Werte von 16,9 % und 17,0 % bekannt (Musharraf et al., 2012, Rugnini et al., 2020), gemessen wurden aber auch schon 61 % (Zhang et al., 2022). Zuletzt wurde die *C. vulgaris* Probe im nun aufgeschlossenen Zustand extrahiert. Der Wert konnte hier von zuvor 3,1 % (ohne Aufschluss) auf 51 % gesteigert werden (Laubenstein, 2022).

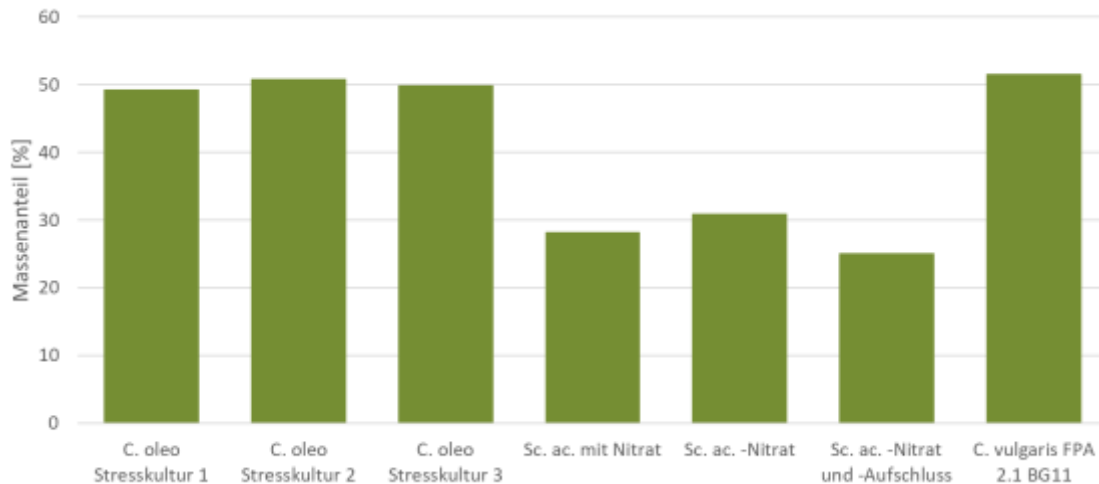


Abb. 27: Massenanteil an extrahierten Algenölen aus verschiedenen Algen-Kultivierungen und Soxhlet-Extraktion mit Hexan-Methanol-Gemisch (80/20 v/v) (Laubenstein, 2022).

Die zunächst geplante Superfluid-Extraktion zur Abtrennung der Mikroalgen konnte im Projektzeitraum nicht wie geplant durchgeführt werden. Dies hatte im Wesentlichen folgende Gründe:

- Probleme mit dem Druckaufbau und der Stabilität des Druckes in der an der FE 1 vorhandenen Hochdruckextraktionsanlage, die sich auch nach Austausch von Komponenten und Kontakt zum Anlagenbauer nicht vollständig beheben ließen.
- Die Menge an trockener Algenbiomasse, die für die Extraktion in der Versuchsanlage (Volumen Extraktor: 500 mL) erforderlich ist und durch zahlreiche Ansätze in den 6 L-Bioreaktoren im Technikum der FE 2 unter

vergleichbaren Bedingungen mit vergleichbarer Abwasserzusammensetzung hergestellt werden muss.

In dem beantragten Folgeprojekt (Kurztitel: OMiPaP, AiF-Antragsnr. 09742/23, IGF-Antrags-Nr. 2024-00740) sollen diese Untersuchungen wieder aufgenommen werden.

3.6.2 Chemische Analyse der gebildeten Fettsäureester

Die Untersuchung der Zusammensetzung der Algenöle auf Fettsäuremethylester (FAME) erfolgte in Anlehnung an die DIN EN 14103:2020-4 mit Hilfe eines Gaschromatographen in Kombination mit einem massenselektiven Detektor. Dazu wurden die aus den Extrakten der Mikroalgen gewonnenen Lipide mit Hilfe von Methanol und Bortrifluorid zu FAME umgeestert und mit Isooctan aufgenommen. Die im organischen Lösungsmittel Isooctan löslichen Substanzen werden mit dieser Methode identifiziert und quantifiziert.

Zum Einsatz kommt ein Gaschromatograph GC 6890 N (Agilent Technologies) mit massenselektivem Detektor 5975B VL MSD (Agilent Technologies), einem Multi-Sampler MPS2-Twister (Gerstel) mit 10 µL Glasspritze, einem Injektor (CIS3, Gerstel) und einer unpolaren Säule (19091S-436 HP-5MS, Agilent Technologies). Das eingestellte Injektionsvolumen in das verwendete Trägergas (Helium) betrug 1,2 µL. Das verwendete Temperaturprogramm der Messungen startet die Trennung bei einer Ofentemperatur von 60 °C. Diese Initialtemperatur wurde 2 min gehalten. Mit einer Rate von 8 °C/min wurde dann der Säulenofen auf 210 °C erhitzt und verblieb bei dieser Temperatur für 4 min. Nun wurde die Temperatur erneut erhöht und zwar mit einer Rate von 5 °C/min und mit einem angesteuerten Endwert von 310 °C. Dieser Wert wurde für zehn Minuten konstant gehalten und die Messung dann beendet.

Für die Identifizierung der Substanzen wurde ein FAME-Mix-Standard der Fa. Supelco (CRM47885) mit 37 verschiedenen Komponenten in drei verschiedenen Konzentrationen (200, 400 und 600 µg/ml) eingesetzt. Als interner Standard kam Nonadecansäure-methylester zum Einsatz.

Ein Beispiel-Chromatogramm für die Analyse des FAME-Standards unter den oben genannten chromatographischen Bedingungen ist in Abb. 28 dargestellt.

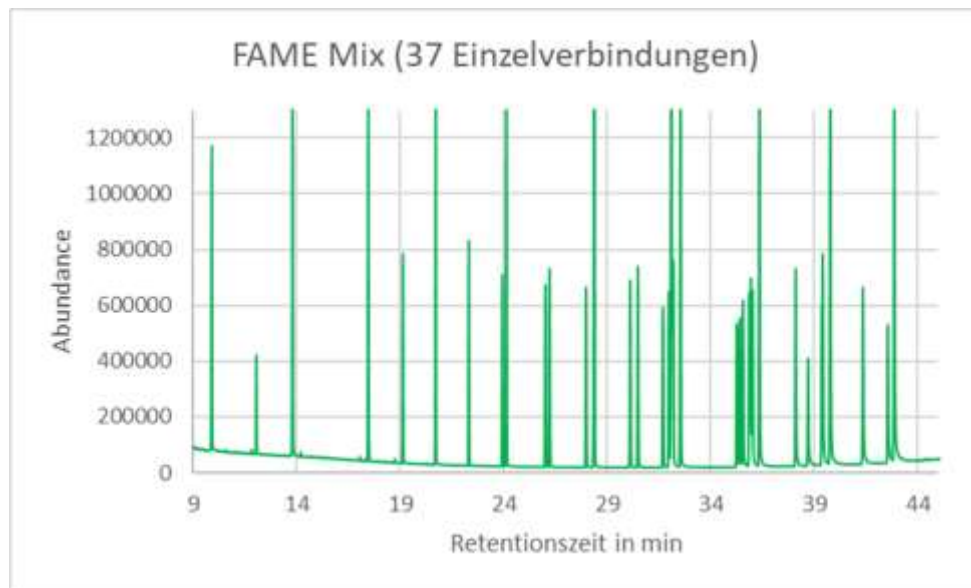


Abb. 28: Chromatogramm FAME-Mix Standard (aufgenommen als Total Ionen Chromatogramm TIC) (Laubenstein, 2022).

Die qualitative Zuordnung der Peaks der unbekanntenen Proben (Algenöle aus Mikroalgenkultivierung und nachfolgender Extraktion) erfolgte durch einen Abgleich der Massenspektren der Peaks im TIC mit den eigenen Standards und einer Datenbank (NIST). Über den Vergleich der Retentionszeiten und der Massenspektren wurden die Peaks der Proben identifiziert. In wenigen Fällen wurden FAME-Einzelstoffe als Standards beschafft, um schwer trennbare Verbindungen im Chromatogramm nebeneinander zuordnen zu können. Durch nachfolgende Integrationen der Peaks konnte über das Flächenverhältnis der einzelnen Substanzpeaks im Vergleich zu der Gesamtfläche der FAMES im Chromatogramm eine Quantifizierung der Substanzen erfolgen (näherungsweise gültig).

Die Extrakte der Mikroalgen wurden nach Umesterung im Verhältnis 1:10 mit Isooctan verdünnt, um die Säule nicht zu überfrachten und die optimale Trennung der Verbindungen zu gewährleisten. In Abb. 29 und Abb. 30 sind beispielhaft Chromatogramme der FAME aus der Mikroalgenextraktion dargestellt.

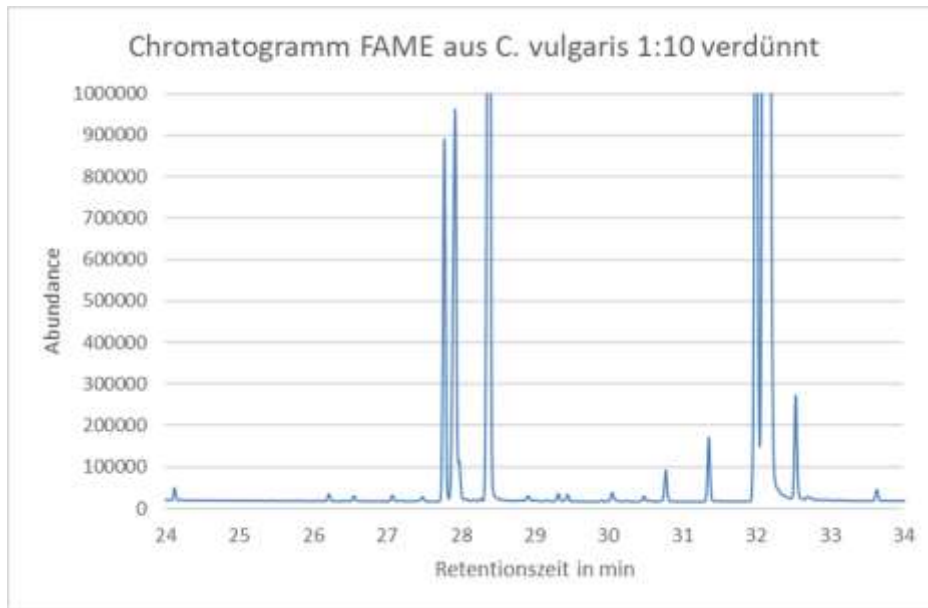


Abb. 29: Chromatogramm FAME aus *C. vulgaris* (Laubenstein, 2022).

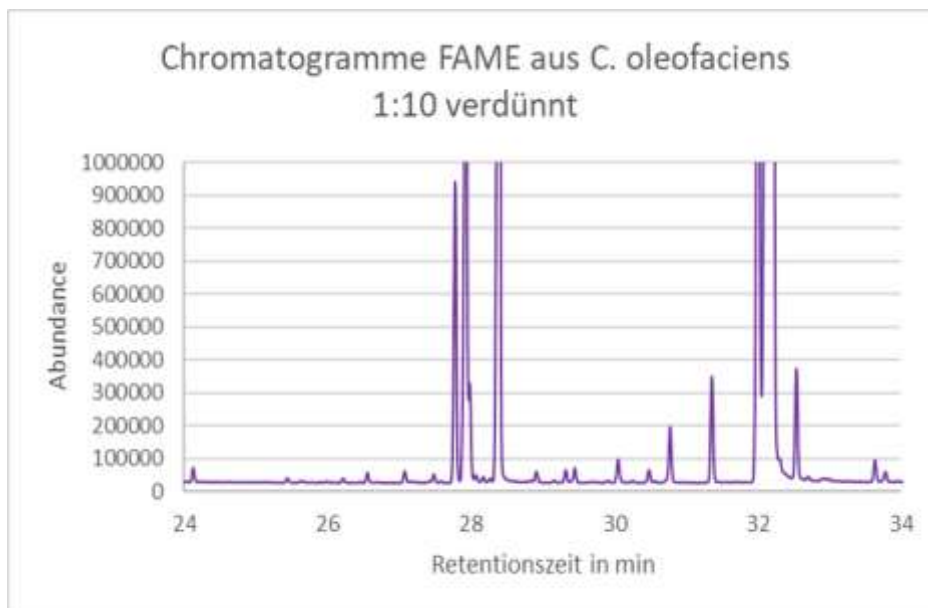


Abb. 30: Chromatogramm FAME aus *C. oleofaciens* (Laubenstein, 2022).

Die Chromatogramme zeigen für alle untersuchten Algenstämme zahlreiche FAME-Peaks, die untereinander nahezu deckungsgleich sind. Offensichtlich ist das Profil an Fettsäuren, das von den Mikroalgen produziert wird, vergleichbar.

Tab. 19: Zusammensetzung FAME-Profil am Beispiel des Extraktes von *C. vulgaris* (Laubenstein, 2022).

56/22		Algen <i>C. vulgaris</i>			n-Heptan							
Lfd. Nr.	FAME-bez.	Peak-Fläche		Verd.-Faktor	Peak-Fläche x Verd.-F		Summe FAME-Peakflächen		% Anteil von FAME _{ges}		MW	
		a	b		a	b	a	b	a	b		
1	Tetradecansäure-methylester	7301134	9506526	1	7301134	9506526	3314664685	3791925009	0,2	0,3	0,2	
2	Pentadecansäure-methylester	4819883	6289982	1	4819883	6289982	3314664685	3791925009	0,1	0,2	0,2	
3	trans-7,10-Hexadecadiensäuremethylester	228773624	286648911	1	228773624	286648911	3314664685	3791925009	6,9	7,6	7,2	
4	cis-9-Hexadecensäure-methylester	329948364	402215144	1	329948364	402215144	3314664685	3791925009	10,0	10,6	10,3	
5	Hexadecansäure-methylester	691864545	807855328	1	691864545	807855328	3314664685	3791925009	20,9	21,3	21,1	
6	Heptadecansäure-methylester	4302473	5532848	1	4302473	5532848	3314664685	3791925009	0,1	0,1	0,1	
7	cis-9-Octadecensäure-methylester	1973455891	2184205206	1	1973455891	2184205206	3314664685	3791925009	59,5	57,6	58,6	
8	Octadecansäure-methylester	66805241	81613026	1	66805241	81613026	3314664685	3791925009	2,0	2,2	2,1	
9	cis-11-Eicosensäure-methylester	4568212	4084735	1	4568212	4084735	3314664685	3791925009	0,1	0,1	0,1	
10	Docosansäure-methylester	819778	959079	1	819778	959079	3314664685	3791925009	0,0	0,0	0,0	
11	Tricosansäure-methylester	580094	1027015	1	580094	1027015	3314664685	3791925009	0,0	0,0	0,0	
12	Tetracosansäure-methylester	1425446	1987209	1	1425446	1987209	3314664685	3791925009	0,0	0,1	0,0	

Durch Auswertung der Peakflächen konnten in dieser Probe ca. 59 % cis-9-Octadecensäuremethylester (einfach ungesättigter C18-FAME), ca. 21 % Hexadecansäuremethylester (gesättigter C16-FAME) und ca. 10 % cis-9-Hexadecensäuremethylester (einfach ungesättigter C16-FAME) bestimmt werden.

Qualitätsanforderungen an Biodiesel sind in EN 14214 beschrieben. Hochwertiger Biodiesel muss Grenzwerte für den Linolensäuremethylestergehalt (C18:3, cis-9,12,15-Octadecatriensäure) zwischen 1 und 15 % einhalten, ein Wert der Cetanzahl von über 51, sowie definierte Eigenschaften in Hinsicht auf die oxidative Stabilität, die Viskosität und Schmierfähigkeit, die Kaltflusseigenschaften und die Verbrennungswärme (Knothe, 2005, Wu et al., 2012). Die FAME-Proben aus den Extrakten der Mikroalgen sollten diese Anforderungen möglichst erfüllen. Als guter Wert für die Verbrennungswärme gilt ein hoher Anteil an Hexadecansäuremethylester (C16:0). Dieser Wert lag bei der Probe der *S. acuminatus* am höchsten. Ebenfalls wichtig ist ein hoher Gehalt an Ölsäure-methylester (C18:1, cis-9-Octadecensäure-methylester), da dieser Methylester die optimale oxidative Stabilität zur Nutzung als Biodiesel aufweist (Wu et al., 2012). Dieser Wert lag bei allen drei Proben sehr hoch, aber innerhalb der Summenpeaks und somit konnte der Einzelwert nicht ermittelt werden. Die Algen besitzen durch hohe C16:0 Anteile und den hohen Gesamtanteil an C18:1 und C18:3 auf den ersten Blick gute Fettsäurezusammensetzungen zur

Biodieselherstellung. Zusätzlich würde ein ausgeglichenes Verhältnis an ungesättigten und gesättigten Fettsäureketten, welches die oxidative Stabilität erhöht, die Eignung weiter positiv beeinflussen (Wu et al., 2012). Durch Aufbereitung über katalytische Hydrierung oder Blenden mit anderem Dieselkraftstoffen könnte dieser Gehalt verbessert werden (Knothe, 2005, Schenk et al., 2008). Auch kann durch die Variation von Prozessparametern während der Kultivierung Einfluss auf die Lipidakkumulation und deren Fettsäureprofile genommen werden (Dillschneider, 2014, Larson, Rees, 1996, Mata et al., 2010).

3.6.3 Anpassung der Stressbedingungen für die Lipidproduktion

Vorgesehen war, in AP 6 weitere Untersuchungen zur Optimierung der Lipidproduktion durchzuführen. Als weitere Stressfaktoren neben Nährstoffmangel kommt die Variation der Beleuchtung hierzu in Frage. Bekannt ist, dass Mikroalgen unterschiedlich auf bestimmte Licht-Wellenlängen reagieren. Beispielsweise konnte mit Licht im UV-A Bereich die Lipidbildung gesteigert werden (Srinivas, Ochs, 2012). Gleichzeitig werden langkettige ungesättigte Fettsäuren durch UV-Licht reduziert, sodass der Anteil an gesättigten Fettsäuren steigt. Letztere sind für die Biodieselproduktion günstig (Forján et al., 2011).

Als weitere vorteilhafte Wellenlänge wird Infrarotlicht beschrieben (Amaro et al., 2020). Zur Untersuchung dieser Faktoren wurde je eine LED-Lampe mit UV-Licht (365 nm) bzw. Infrarotlicht-Anteil (730 nm) beschafft und in einem Versuch zur Steigerung der Lipidbildung eingesetzt.

Tab. 20: Unterschiedliche Lichtfarben der verwendeten Lampen im Versuch zur Steigerung der Mikroalgen-Lipidbildung.

	Lichtfarbe 1	Lichtfarbe 2	Lichtfarbe 3
Lampe 1, Wachstum	6500 K	2100 K	660 nm
Lampe 2, UV	6500 K	365 nm	6500 K
Lampe 3, Infrarot	2100 K	730 nm	2100 K

Versuchsdurchführung

Für die Kultivierung wurden Blasensäulenreaktoren verwendet, die an der FE 2 zur Verfügung stehen. Definierte Lichtbedingungen wurden durch den Einbau dieser

Reaktoren in verschließbare Reaktorgehäuse gewährleistet. In Kultivierungsphase 1 wurden alle Versuchsansätze mit blau-rottem Licht beleuchtet. Unter diesen Bedingungen wachsen die Algenkulturen optimal. In Kultivierungsphase 2 wurde je ein Ansatz mit Infrarotlicht bzw. mit UV-Licht behandelt. Die Kontrolle wurde mit blau-rottem Licht weitergeführt. Nach Abschluss der Kultivierung wurde die Biomasse geerntet und der Lipidgehalt sowie das Fettsäuremuster bestimmt.

Ergebnisse:

Der Versuch erwies sich als wenig erfolgreich. Die Beleuchtung mit unterschiedlichen Wellenlängen führte nicht zu einer nennenswerten Erhöhung des Lipidgehaltes (s. Abb. 31). Der Anteil betrug zwischen 25 und 27 % der Trockenmasse. Im Fettsäureprofil wurden ebenfalls keine deutlichen Unterschiede festgestellt (s. Abb. 32) und die Beleuchtung mit unterschiedlichen Licht-Wellenlängen als nicht geeignet bewertet.

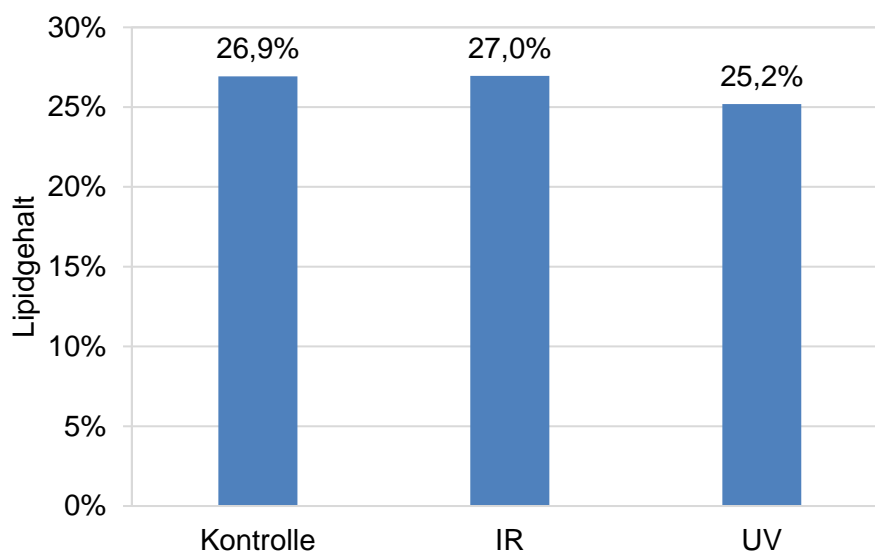


Abb. 31: Lipidgehalt der Mikroalge *S. acuminatus* bei unterschiedlichen Licht-Wellenlängen (Malsi, 2022).

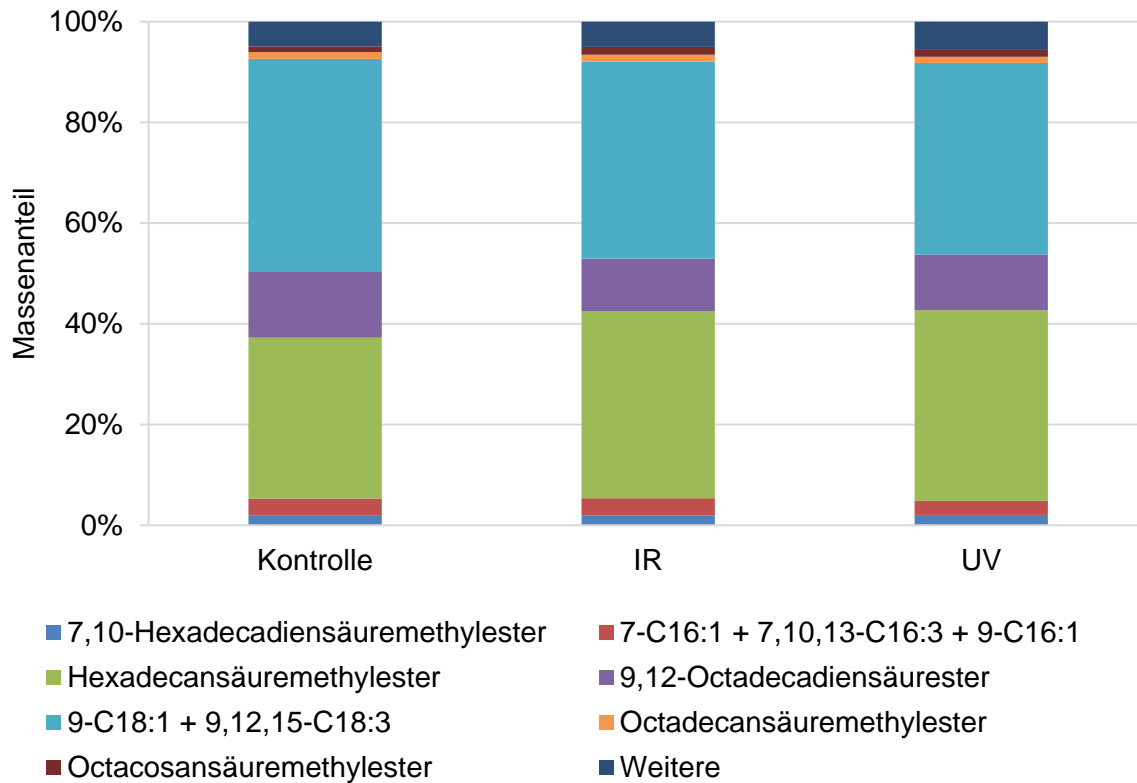


Abb. 32: Fettsäureprofil der Mikroalge *S. acuminatus* bei unterschiedlichen Licht-Wellenlängen (Malsi, 2022).

3.6.4 Zusammenfassung AP 6

Die Extraktion der Lipide aus der Biomasse der Mikroalgen konnte mit Hilfe der Flüssigextraktion (Soxhlet) und einer Mischung aus 80 % Hexan und 20 % Methanol (v/v) erfolgreich durchgeführt werden. Nach Zellaufschluss und Extraktion konnten wiederholt Ausbeuten von bis zu 50 % an Algenölen gemessen werden. Die Analytik zur Zusammensetzung der Fettsäuremethylester (FAME) in den gewonnenen Algenölen mittels GC/MS konnte erfolgreich etabliert werden, allerdings ist die Trennung der zahlreichen Einzelsubstanzen noch nicht in jedem Fall möglich, so dass in Ausnahmefällen Summengehalte von zwei FAME-Einzelverbindungen angegeben werden müssen. Das Fettsäureprofil ist bezüglich einer späteren Nutzung für Biodiesel aufgrund der enthaltenen gesättigten und ungesättigten C16 und C18-Verbindungen gut geeignet.

Der Versuch, die Lipidbildung über Beleuchtung mit unterschiedlichen Wellenlängen zu steigern, erwies sich nicht als erfolgreich.

3.7 Arbeitspaket 7: Up-Scaling, Vergleich der Testergebnisse im Labor- und Technikumsmaßstab und Kostenschätzung

In AP 7 sollten die Versuche in die nächstgrößere Prozessstufe hochskaliert werden und darauf basierend das Algensystem in Hinblick auf die zukünftige Ausführung in einer Papierfabrik bilanziert werden.

Die Arbeitsziele wurden nur teilweise erreicht. Das geplante Up-Scaling der Algenkulturen in 28-Liter-Reaktoren konnte aus technischen Gründen nicht durchgeführt werden. Zur Bilanzierung wurden die Ergebnisse der Versuche mit den 6-Liter-Reaktoren als ausreichend eingestuft.

Ein weiterer wichtiger Punkt im Rahmen des Up-Scaling ist das *downstream processing*. Zur Optimierung der Ernte von größeren Mengen an Algenbiomasse bietet sich ein Tellerseparator an. Der Tellerseparator wurde zu Beginn dieses APs erprobt.

3.7.1 Algenernte mittels Tellerseparator

Tellerseparatoren scheiden Feststoffe und Flüssigkeiten unter Ausnutzung der Zentrifugalkraft voneinander ab. Im Gegensatz zu gewöhnlichen Zentrifugen ist in der Trommel ein zusätzliches Tellerpaket vorhanden. Die größere Klärfläche steigert Effizienz und Produktivität. Kontinuierliche Prozessführung ist möglich, Tellerseparatoren eignen sich daher für die Algenernte in größerem Maßstab (GEA, 2023).

An der FE2 steht ein Tellerseparator der Firma GEA (STC 3-06-107) zur Verfügung, mit dem das Verfahren getestet werden konnte (Abb. 33). Eine Algensuspension (Biomassekonzentration 6 g/L) aus einem der 6L-Reaktoren wurde in die Separator-Trommel gegeben und mit 10000 U/min betrieben. Das Trennprodukt war ungefähr um den Faktor 6 aufkonzentriert und befand sich in einem noch fließfähigen Zustand.



Abb. 33: Tellerseparator (STC 3-06-107) der Firma GEA an der FE2 zur Algenernte im größeren Maßstab.

Mit den durchschnittlich erreichten Biomassekonzentrationen von ca. 6 g/L könnte so der Feststoffgehalt von 0,6 % auf 3,6 % gesteigert werden. In der Literatur werden bis zu 15 % beschrieben (Schmid-Staiger et al., 2016).

Trotz der unvollständigen Entwässerung wurde das Verfahren als positiv bewertet, weil für den nachfolgenden Prozessschritt (Zellaufschluss Hochdruckhomogenisator) ein Feststoffgehalt unter 10 % ohnehin erforderlich ist. Für die Ernte im größeren Maßstab ist der Tellerseparator als geeignet einzustufen, der Prozess bietet noch Potential zur Erhöhung des Entwässerungsgrades.

3.7.2 Prozessbilanzierung

Ziel der Prozessbilanzierung war die Bewertung des Algensystems bezüglich des wirtschaftlichen und ökologischen Aspekts. Anhand der erarbeiteten Daten konnte eingeschätzt werden, ob eine zukünftige Etablierung in einer Papierfabrik rentabel ist oder nicht.

Die für die Prozessbilanzierung relevanten Parameter wurden in Abb. 34 zusammengestellt und in Tab. 21 beschrieben:

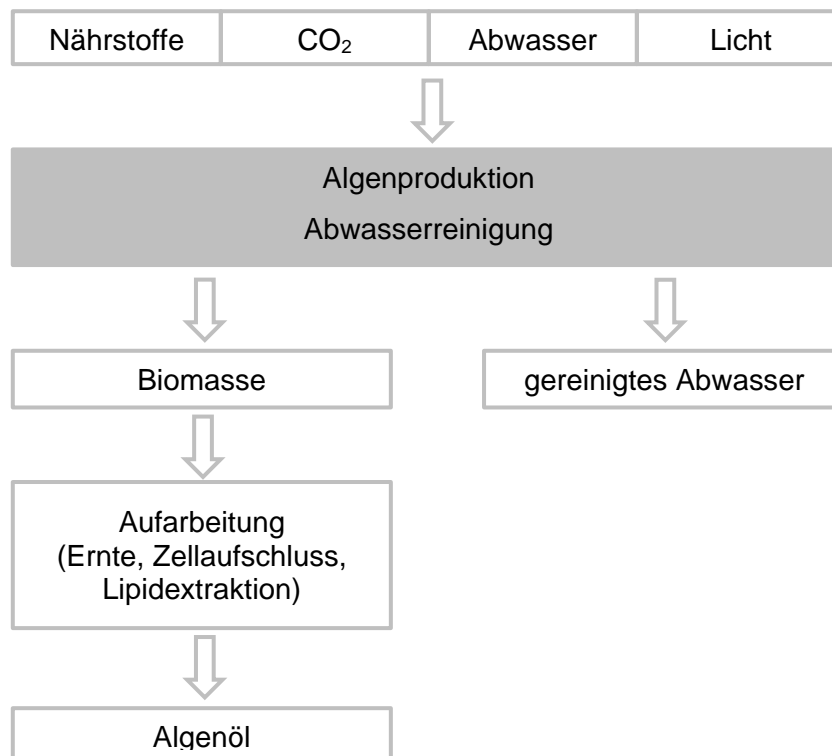


Abb. 34: Übersicht zum Algensystem.

Tab. 21: Beschreibung zu prozessrelevanten Parametern.

Parameter	Beschreibung
CO ₂	<ul style="list-style-type: none"> Als Quelle kommt industrielles Abgas-CO₂ in Frage Am Fraunhofer Institut wurde 2016 bereits Gärgas eines deutschen Energie-Unternehmens als alleinige CO₂-Quelle im Pilotmaßstab erfolgreich eingesetzt (Schmid-Staiger et al., 2016) CO₂ ist daher als Kostenfaktor zu vernachlässigen, der Aufbau der Infrastruktur müsste allerdings berücksichtigt werden
Beleuchtung	<ul style="list-style-type: none"> Artifizielle Beleuchtung gehört zu den wichtigsten Kostenfaktoren (Blanken et al., 2013) Die Hochrechnung zum Energieverbrauch anhand der in diesem Projekt erzielten Daten ergab einen Aufwand von 437 kWh/kg Algenbiomasse*

Parameter	Beschreibung
	<ul style="list-style-type: none"> • In der Literatur wird daher die Nutzung von Sonnenlicht angestrebt, obwohl dies mit geringerer Biomasseproduktivität einhergeht (Oostlander et al., 2020) • Der Verzicht auf artifizielles Licht ist unter deutschen Klimaverhältnissen nicht undenkbar: In der oben erwähnten Quelle des Fraunhofer Instituts wurden bei Freilandversuchen zufriedenstellende Ergebnisse erzielt (Schmid-Staiger et al., 2016)
Nährstoffe	<ul style="list-style-type: none"> • Hauptbedarf liegt bei Nitrat und Phosphat • Optimal wäre ein Recycling aus Abfallströmen, alternativ wird im industriellen Maßstab auch auf günstige Bulk-Chemikalien (z. B. Urea) verwiesen (Vázquez-Romero et al., 2022)
Aufarbeitung	<ul style="list-style-type: none"> • Für Ernte, Zellaufschluss und Lipidextraktion wurden in diesem Projekt Verfahren erarbeitet • Für eine Aufstellung der Gesamtkosten waren die vorliegenden Daten nicht ausreichend • Laut Literatur kann allein die Lipidextraktion über 50 % des Energieverbrauchs bei der Algenöl-Herstellung einnehmen (Dasan et al., 2019) • Kosten für Geräteinvestition und Betriebskosten im <i>downstream processing</i> sollten daher nicht unterschätzt werden
Biomasse	<ul style="list-style-type: none"> • Produktivität: 0,61 g/L/Tag
Algenöl	<ul style="list-style-type: none"> • Produktivität: 0,17 g/L/Tag
Abwasser	<ul style="list-style-type: none"> • Entfernung von EDC-Rückständen in der Nachklärung • Anstieg des CSB-Wertes durch leicht biologisch abbaubare Algen-Metabolite • Stickstoff und Phosphor sind in der Nachklärung schon ausreichend eliminiert

*Bei Nutzung eines großtechnischen Reaktors (180 L) mit einer 2000 W LED-Lampe

Die Ausführungen zeigen, dass die Bilanzierung von vielen einzelnen Parametern abhängt, die Energie- und Kostenaufwand des Algensystems unterschiedlich stark beeinflussen. Eine umfassende Bilanzierung hätte den Rahmen des Projekts überstiegen. Für die Analyse wurden deshalb schwer kalkulierbare Parameter ausgeblendet und eine Bilanz auf Basis der verfügbaren Daten berechnet. Berücksichtigt wurden der Energieverbrauch für die artifizielle Beleuchtung und die Produktivität des Algensystems.

In Tab. 22 ist die Bilanzierung aus ökologischer Sicht zu sehen. Gezeigt ist das Resultat der elftägigen Kultivierung des Algenstamms *S. acuminatus* im Technikumsmaßstab. Die Reduktion der BPA-Konzentration ist als vielversprechend

einzuordnen. Da die Nachweisgrenze bei der Messung unterschritten wurde, ist eine vollständige Substanz-Entfernung nicht auszuschließen. Pro Abbau von 1 µg Substanz werden demnach maximal 5,9 g Algenbiomasse benötigt. Die Daten sind zur ersten Einschätzung gut geeignet, für genauere Angaben wäre ein kontinuierlicher Prozess sinnvoller.

Tab. 22: Bilanz einer elftägigen Kultivierung der Mikroalge *S. acuminatus*.

	Inputs	Outputs
Produktion	2,94 g Algenstartkultur	<u>40,26 g Gesamt Biomasse</u>
	7,8 g Nitrat	11,19 g Algenlipide
	0,5 Phosphat	19,85 g Kohlenhydrate
	Spurenelemente*	9,22 g Rest
	3,10 kg CO ₂	
	84,48 kWh Dauerbeleuchtung	
Abwasserreinigung	<u>6 Liter Nachklärung</u>	<u>6 Liter Nachklärung</u>
	9,6 µg BPA	< 3,3 µg BPA

*s. BG11-Medium AP 1

Bezüglich der Biodieselproduktion ist in Tab. 23 eine Bilanz auf wirtschaftlicher Basis gezeigt. Zur Einschätzung wurden die Ergebnisse auf einen großtechnischen Bioreaktor (180 Liter) übertragen und mit dem aktuellen Preis für herkömmlichen Biodiesel verglichen.

Tab. 23: Bilanzierung des Algensystems auf Basis der Beleuchtung und Produktivität.

	Wert	Einheit
Energieverbrauch LED Lampe 180 L Reaktor	2000	W
Strom-Großhandelspreis*	19,919	Cent/kWh
Biomasse-Produktivität	0,61	g/L/Tag
Algenöl-Produktivität	0,17	g/L/Tag
Kosten Biomasse	87,08	€/kg
Kosten Algenöl	313,34	€/kg
herkömmlicher Biodiesel (FAME) Preis**	1,56	USD/kg

*27.01.2023

**03.01.2023 Quelle: Platts

Die berechneten Daten zeigen eine deutlich negative Bilanz, was nicht unerwartet ist und grundsätzlich mit den Erkenntnissen aktueller Literatur übereinstimmt.

Algenbasierten Biotreibstoffen stehen zahlreiche Forschungsfragen und Innovationen entgegen, wobei als wichtigste Punkte zur Kostensenkung nach wie vor die Verknüpfung mit anderen Verfahren wie der Abwasserreinigung sowie der weiteren Ausschöpfung der restlichen Biomasse nach der Algenöl-Extraktion empfohlen werden (Schmid-Staiger et al., 2016, Schröter-Schlaack, Aicher, 2019).

4 Fazit

Im vorliegenden Projekt konnte ein Algensystem zur gleichzeitigen Produktion von Biotreibstoffen/Biokunststoffen und Entfernung von EDC-Rückständen aus vorgereinigten Abwässern der Papierindustrie erarbeitet werden.

Das Projektziel wurde erreicht, allerdings besteht vor weiteren großtechnischer Umsetzung noch an mindestens zwei Punkten deutlicher Optimierungsbedarf.

Zum einen wurde im Rahmen der Algenbehandlung ein Anstieg des Abwasserparameters CSB festgestellt. Im Rahmen des geplanten Folgeprojektes soll dieses Problem durch Zugabe von Bakterienkulturen zur weiteren Abwasserreinigung gelöst werden.

Zum anderen weist das untersuchte System eine negative Energie- und Kostenbilanz auf. Obwohl dies nach derzeitigem Forschungsstand nicht unerwartet ist und weitere Innovationen notwendig sind, wird das Potential eines algenbasierten Treibstoffs nach wie vor als hoch eingeschätzt. Die gleichzeitige Nutzung von CO₂ aus der Abluft der Papierfabriken zur Biomasseproduktion ist ein weiterer wichtiger Aspekt für die Nutzung dieser Technologie.

Die hier gewonnenen Daten und Erkenntnisse sind somit wichtige Faktoren im Bereich der Algenbiotechnologie und Abwasserbehandlung. Aus Sicht der Projektbearbeiter sollten besonders folgende Ergebnisse beachtet und weiterverfolgt werden:

- Die Ergebnisse zur Spurenstoffanalytik zeigen, dass trotz der konventionellen Abwasserreinigung in der Papierindustrie endokrin wirksame Substanzen zurückbleiben können. Obwohl die Konzentrationen gering sind, zeigen aktuelle Entwicklungen zur strengeren toxikologische Einstufung von endokrin wirksamen Stoffen (insbesondere Bisphenol A) und zur erforderlichen Qualität von Trinkwasser, dass in Zukunft mit schärferen Grenzwerten zu rechnen ist. Die Auswirkung der

endokrin wirksamen Substanzen auf die menschliche Gesundheit sollte somit nicht unterschätzt werden und unterstreicht den Anspruch auf eine zusätzliche Reinigung.

- Es wurden im Vergleich zu anderen Studien mit Algenkultivierung deutlich höhere Biomasseerträge erzielt. Obwohl Kultivierungsbedingungen, Abwasser-Zusammensetzung und Nährstoffkonzentration in der Literatur nicht einheitlich sind und somit ein Vergleich nur unter Vorbehalt möglich ist, scheint der ausgewählte Mikroalgenstamm *Scenedesmus acuminatus* für die Kultivierung in Abwasser sehr gut geeignet zu sein. Aktuell sind nur sechs Publikationen zur Anwendung von diesem Algenstamm veröffentlicht worden.
- Die eingesetzten Flachplatten-Algenreaktoren für die Kultivierung im Technikumsmaßstab erwiesen sich als günstig. Dieses Reaktorsystem ist laut Hersteller hauptsächlich für die Branchen Nahrungsergänzungsmittel, Pharma, Kosmetik und Tierfutter vorgesehen. In Bezug auf die Algen-Abwasserbehandlung gibt es nach aktueller Recherche noch keine Untersuchungen. In dem 2014 durchgeführten PTS-Projekt zur algenbasierten Reinigung von Papierfabrikabwasser hatte die Verwendung von offenen Reaktoren mehrfach zu Problemen mit Kontaminationen geführt. Geschlossene Reaktoren, auch in größerem Maßstab und bei geeigneter Infrastruktur, könnten hierfür eine sinnvolle Alternative sein.

5 Wirtschaftliche Bedeutung der Forschungsergebnisse für kleine und mittlere Unternehmen (KMU)

5.1 Voraussichtlicher Nutzen der Forschungsergebnisse

Im Rahmen des vorliegenden Forschungsvorhabens wurden Mikroalgen für die gleichzeitige Biotreibstoff- /Biokunststoffproduktion und Reinigung von Abwässern der Papierindustrie untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass aus einem geeigneten Mikroalgenstamm Algenöle mit günstigen Produkteigenschaften hergestellt werden können. Die Kultivierung kann in vorgereinigten Abwässern der Papierindustrie stattfinden, wobei gleichzeitig Rückstände von endokrin wirksamen Substanzen durch den Algenstoffwechsel signifikant gesenkt werden.

Die Ergebnisse stehen dem Forschungsgebiet der Algen-Biotechnologie zur Verfügung. Nutzer sind neben den Papierfabriken und ggf. produzierenden Unternehmen anderer Wirtschaftszweige mit hoher organischer Fracht im Abwasser

(z.B. Brauereien, Molkereien, Lederindustrie) kurzfristig insbesondere Anlagenbauer und -planer aus den Bereichen der Abwassertechnik und der Biotechnologie sowie beratende Ingenieurbüros.

5.2 Voraussichtlicher Beitrag zur Steigerung der Wettbewerbsfähigkeit

Die Ergebnisse werden insbesondere für die KMU der Papierherstellung von Interesse sein. Eine gleichzeitige Detoxifikation des Papierfabriksabwassers und Produktion von Biomasse mit positivem Marktwert könnte dazu führen, dass der Herstellungsprozess gerade bei kleineren Unternehmen rentabler wird und ihre Marktposition gestärkt wird. In der Wertschöpfungskette werden sich für die Extraktion der Lipide aus der Algenbiomasse und für die Produktion von Biokunststoffen und –kraftstoffen und insbesondere von deren Vorprodukten erzeugernah kleinere Unternehmen ansiedeln und gründen. Neben der Elimination von Problemstoffen aus dem Abwasser der Papierindustrie bietet die Algenbiomasse interessante Nutzungsmöglichkeiten. Die Biomasse kann zur Produktion von Biokraftstoffen oder Biokunststoffen an spezifische Unternehmen weiter veräußert werden. In diesem neuen Geschäftsfeld werden sowohl Existenzgründungen als auch Diversifizierung in bestehenden Unternehmen erwartet. Mittelfristig werden vor allem auch Unternehmen von den Ergebnissen profitieren, die nachhaltig produzierte Biomasse weiterverarbeiten. Der Anteil an KMU in diesen Wirtschaftszweigen ist unterschiedlich hoch. Insbesondere im Bereich der Herstellung von Biotreibstoffen und -kunststoffen bzw. diversen Vorprodukten sind viele KMU auf dem Markt tätig oder derzeit in Gründung. Die angestrebten Ergebnisse werden in den KMU's der Wirtschaftszweige Herstellung von Papier und Pappe (17) und Maschinenbau (28) auf hohes Interesse stoßen. Das Forschungsthema umfasst Schnittmengen zu den Fachgebieten Ressourceneffizienz Rohstoffe (FD), Produktionstechnologien (MA) und Umwelttechnik (FB).

5.3 Aussagen zur voraussichtlichen Umsetzung der FuE-Ergebnisse

Einige der im Rahmen des Projektes erlangten Erkenntnisse (Nutzbarkeit des Papierfabriksabwassers für Mikroalgenkultivierung, Ergebnisse zu Biomasse- und Lipidproduktion verschiedener Algenstämme, Verhalten der Mikroalgen unter Stressbedingungen, verfahrenstechnische Maßnahmen zum Zellaufschluss,

Zusammensetzung der Algenöle, etc.) können direkt in die Praxis umgesetzt werden. Der Einsatz der Mikroalgen in der Abwasserreinigung der Papierherstellung ist zum aktuellen Stand der Erkenntnisse noch nicht empfehlenswert, da dem Nutzen der Produktion der Algenöle noch der CSB-Anstieg im gereinigten Abwasser nach Mikroalgenkultivierung entgegensteht. Um verschiedene verfahrenstechnische Möglichkeiten zu untersuchen, diesem Problem z. B. durch Ansatz einer Co-Kultur aus Algen und Bakterien in der Abwasserreinigung entgegenzuwirken, wurde ein IGF-Folgeantrag zu diesem Forschungsvorhaben eingereicht (Kurztitel: OMiPaP, AiF-Antragsnr. 09742/23, IGF-Antrags-Nr. 2024-00740). Dieser Projektantrag ist im Januar 2024 positiv begutachtet worden, so dass von einer Weiterführung der Forschungsarbeiten zu diesem Projekt auszugehen ist.

6 Maßnahmen zum Ergebnistransfer

Die im Projektantrag dargestellten Maßnahmen zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft wurden planmäßig durchgeführt. Bereits während der Projektlaufzeit wurde das Thema bei verschiedenen Fachveranstaltungen und in diversen Vorträgen vorgestellt sowie in der akademischen Lehre, z. B. durch Erstellung von Masterarbeiten und Postern bearbeitet und verbreitet. Eine Auflistung der während der Projektlaufzeit durchgeführten Transfermaßnahmen ist in Tab. 24 dargestellt.

Tab. 24: Durchgeführte Transfermaßnahmen während der Projektlaufzeit

Maßnahme	Ziel/Bemerkung	Zeitraum
Veröffentlichung auf der Internetseite des PMV	Vorstellung des Forschungsvorhabens www.pmv.tu-darmstadt.de	Laufend
Treffen des projektbegleitenden Ausschusses	1. Vorstellung des Forschungsvorhabens, Diskussion und Festlegung der Vorgehensweise 2. Fortschrittsbericht, Diskussion der bisherigen Ergebnisse, Abstimmung der weiteren Vorgehensweise 3. Abschlusspräsentation, Diskussion der Ergebnisse	26.08.2021, 19.07.2022, 28.08.2023
Beratung kleiner und mittlere Unternehmen	TECHNOLOGIETRANSFER IN INTERESSIERTE UNTERNEHMEN	laufend
Akademische Lehre	Ausbildung von Studierenden: Aufnahme von Projektinhalten in Vorlesung, Tutorien und Praktika in FE 1 und FE 2	laufend
Akademische Lehre und Ausbildung	Erstellung der Masterarbeit „Untersuchung und Selektion von geeigneten Mikroalgen zur Reinigung von Papierfabrikabwasser mit gleichzeitiger Produktion von Lipiden“, Frau Samira Reuscher	15.05.2021 - 15.11.2021

	Erstellung der Masterarbeit „Etablierung der Lipidextraktion und -analytik von im Technikumsmaßstab kultivierten Mikroalgen“, Herr Stefan Laubenstein	11.02.2022 - 25.08.2022
	Erstellung der Masterarbeit „Untersuchung des Einflusses von Licht unterschiedlicher Wellenlängen auf die Lipidbildung von Mikroalgen“, Frau Christina Malsi	06.06.2022 - 19.12.2022
Veröffentlichungen und Präsentationen von signifikanten Ergebnissen	AiF/IGF-Tage der FV Zellstoff- und Papierindustrie, Darmstadt: Vortrag, Diskussion und persönliche Kommunikation, Darmstadt Vortrag: PMV-Tagung „Papier & Umwelt 2022“, Darmstadt	04.11.2021, 13.10.2022 27./28.09.2022

Durch die Veröffentlichungen, Vorträge und Treffen des projektbegleitenden Ausschusses war ein Ergebnistransfer zu KMU bereits während der Projektlaufzeit gewährleistet. Durch die große Anzahl der Projektbegleiter ist zudem eine große Reichweite des Ergebnistransfers bereits während der Projektlaufzeit gegeben. Ziel der Projekttreffen war die kontinuierliche Information der beteiligten Unternehmen sowie die Diskussion der Vorgehensweise und erzielten Ergebnisse. Dies diente einerseits zur Absicherung der Praxisrelevanz der durchgeführten Arbeiten und ermöglichte den Unternehmen andererseits die direkte und zeitnahe Nutzung der Forschungsergebnisse. Durch die Vorstellung des Projektes auf der Internetseite der Forschungsstelle wurde die Öffentlichkeit über die Forschungstätigkeit informiert. Die Vorstellung der Forschungsarbeiten sowie detaillierter Forschungsergebnisse auf Fachtagungen und in Gremien stellte die Bekanntmachung des Forschungsvorhabens und den Wissenstransfer gegenüber dem Fachpublikum aus der papierverarbeitenden Branche sicher. Darüber hinaus wurde das Forschungsvorhaben Interessenten aus Industrie und Forschung auch außerhalb des projektbegleitenden Ausschusses in persönlichen Gesprächen vorgestellt und dessen Inhalte diskutiert.

Weiterhin sind die in Tab. 25 aufgeführten Transfermaßnahmen nach Ende der Projektlaufzeit geplant bzw. bereits umgesetzt.

Die im Forschungsbericht dargestellten Ergebnisse bieten für interessierte Unternehmen einen umfassenden Einblick in die Forschungsarbeiten. Eine entsprechende Kurzzusammenfassung der Forschungsergebnisse ist auf der Homepage des PMV zu finden. Darüber hinaus wird der ausführliche Schlussbericht

nach Akzeptanz durch den Fördermittelgeber publiziert und ist somit für alle Interessierten zugänglich. Weiterhin werden die Forschungsergebnisse durch Veröffentlichungen in Fachzeitschriften verbreitet und insbesondere an das Fachpublikum der oben genannten Tagungen und Gremien herangetragen. Insgesamt sind somit zahlreiche Möglichkeiten gegeben, um die Ergebnisse des Forschungsvorhabens KMUs erfolgreich verfügbar zu machen sowie den Ergebnistransfer in die Wirtschaft sicherzustellen.

Tab. 25: Geplante bzw. bereits umgesetzten Maßnahmen nach Ende der Projektlaufzeit

Maßnahme	Ziel/Bemerkung	Zeitraum
Gremienarbeit	Ergebnistransfer in die Wirtschaft, Präsentation aller relevanten Ergebnisse z. B. ZELLCHEMING-Fachausschuss ENVI, Umweltausschuss des Verbandes Die Papierindustrie	3./4. Qt. 2024
Fachtagungen	AiF/IGF-Tage der FV Zellstoff- und Papierindustrie, Darmstadt: Vortrag, Diskussion und persönliche Kommunikation, Darmstadt Paper & Water Conference, Darmstadt	07.12.2023, 4. Qt 2024 24./25.09. 2024
Posterpräsentation	7th International BioSC Symposium, Bonn	06./07.11. 2023
Veröffentlichungen	Publikation im "Journal of Applied Phycology (Springer) oder "Trends in Biotechnology"	2024
Ergebnisweitergabe an interessierte Fachverbände	Ergebnistransfer in die Wirtschaft, Präsentation der relevanten Ergebnisse (z. B. Verband Die Papierindustrie, CEPI, 4evergreen)	2024
Veröffentlichung im Internet	Ergebnistransfer in die Wirtschaft, Präsentation der Ergebnisse (Internetseiten FE1 und FE2, Forschungsvereinigung Zellstoff- und Papierindustrie im Verband Die Papierindustrie)	2024
Akademische Lehre	Ausbildung von Studierenden: Aufnahme von Projekthinhalten in Vorlesung, Tutorien und Praktika in FE 1 und FE 2 Bachelorarbeit Robin Beck (03/2024 – 06/2024) Masterarbeit Nadine Hilser (04/2024 – 10/2024) Promotion Samira Reuscher (2023 – 2026)	Nach Projektende
Beratung kleiner und mittelständischer Unternehmen	Technologietransfer in interessierte Unternehmen	Nach Projektende
Veröffentlichung des ausführlichen Forschungsberichtes als PDF	Information interessierter Unternehmen über die Forschungsergebnisse	Nach Projektende

7 Danksagung

Das IGF-Vorhaben 21704 N der Forschungsvereinigung „Kuratorium für Forschung und Technik der Zellstoff- und Papierindustrie im VDP e.V.“ wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Klimaschutz aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

Unser Dank gilt weiterhin den Industriepartnern sowie dem projektbegleitenden Ausschuss für die Bereitstellung von Probenmaterial und Unterstützung.

Gefördert durch:



aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Literaturverzeichnis

- Abdur Razzak, S.; Bahar, K.; Islam, K. O.; Haniffa, A. K.; Faruque, M. O.; Hossain, S. Z.; Hossain, M. M. Microalgae cultivation in photobioreactors: Sustainable solutions for a greener future. *Green Chemical Engineering* [Online] **2023**.
- Abou-Shanab, R. A. I.; Ji, M.-K.; Kim, H.-C.; Paeng, K.-J.; Jeon, B.-H. Microalgal species growing on piggery wastewater as a valuable candidate for nutrient removal and biodiesel production. *Journal of environmental management* **2013**, *115*, 257–264. DOI: 10.1016/j.jenvman.2012.11.022.
- Akubude, V. C.; Nwaigwe, K. N.; Dintwa, E. Production of biodiesel from microalgae via nanocatalyzed transesterification process: A review. *Materials Science for Energy Technologies* **2019**, *2* (2), 216–225. DOI: 10.1016/j.mset.2018.12.006.
- Amaro, H. M.; Pagels, F.; Azevedo, I. C.; Azevedo, J.; Sousa Pinto, I.; Malcata, F. X.; Guedes, A. C. Light-emitting diodes—a plus on microalgae biomass and high-value metabolite production. *J Appl Phycol* **2020**, *32* (6), 3605–3618. DOI: 10.1007/s10811-020-02212-2.
- Application of Microalgae in Wastewater Treatment. Volume 1: Domestic and Industrial Wastewater Treatment*; Gupta, S. K., Bux, F., Eds.; Springer eBooks Earth and Environmental Science; Springer: Cham, 2019.
- Arar, Elizabeth. Method 446.0: In Vitro Determination of Chlorophylls a, b, c + c and Pheopigments in Marine And Freshwater Algae by Visible Spectrophotometry.
- Arbib, Z.; Ruiz, J.; Álvarez-Díaz, P.; Garrido-Pérez, C.; Barragan, J.; Perales, J. A. Effect of pH control by means of flue gas addition on three different photo-bioreactors treating urban wastewater in long-term operation. *Ecological Engineering* **2013**, *57*, 226–235. DOI: 10.1016/j.ecoleng.2013.04.040.
- Azizi, D.; Arif, A.; Blair, D.; Dionne, J.; Fillion, Y.; Ouarda, Y.; Pazmino, A. G.; Pulicharla, R.; Rilstone, V.; Tiwari, B.; Vignale, L.; Brar, S. K.; Champagne, P.; Drogui, P.; Langlois, V. S.; Blais, J.-F. A comprehensive review on current technologies for removal of endocrine disrupting chemicals from wastewaters. *Environmental research* **2022**, *207*, 112196. DOI: 10.1016/j.envres.2021.112196.
- Balabanic, D.; Krivograd Klemencic, A. Presence of Phthalates, Bisphenol A, and Nonylphenol in Paper Mill Wastewaters in Slovenia and Efficiency of Aerobic and combined Aerobic-Anaerobic Biological Wastewater Treatment Plants for their Removal. *Fresenius Environmental Bulletin* **2011**, *20*, 93–100.
- Bioökonomie. Webinarreihe der vier Innovationsräume Bioökonomie. <https://blaue-biooekonomie.de/de>.
- Blanken, W.; Cuaresma, M.; Wijffels, R. H.; Janssen, M. Cultivation of microalgae on artificial light comes at a cost. *Algal Research* **2013**, *2* (4), 333–340. DOI: 10.1016/j.algal.2013.09.004.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology* **1959**, *37* (8), 911–917. DOI: 10.1139/o59-099.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **1976**, *72*, 248–254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.
- Campos, H.; Boeing, W. J.; Dungan, B. N.; Schaub, T. Cultivating the marine microalga *Nannochloropsis salina* under various nitrogen sources: Effect on biovolume yields, lipid content and composition, and invasive organisms. *Biomass and Bioenergy* **2014**, *66*, 301–307. DOI: 10.1016/j.biombioe.2014.04.005.
- Carvalho, A. P.; Silva, S. O.; Baptista, J. M.; Malcata, F. X. Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects. *Applied microbiology and biotechnology* **2011**, *89* (5), 1275–1288. DOI: 10.1007/s00253-010-3047-8.
- Chen, Y.; Tang, X.; Kapoore, R. V.; Xu, C.; Vaidyanathan, S. Influence of nutrient status on the accumulation of biomass and lipid in *Nannochloropsis salina* and *Dunaliella salina*. *Energy Conversion and Management* [Online] **2015**, *106*, 61–72. <https://eprints.whiterose.ac.uk/99003/>.

- Cheng, C.-H.; Du, T.-B.; Pi, H.-C.; Jang, S.-M.; Lin, Y.-H.; Lee, H.-T. Comparative study of lipid extraction from microalgae by organic solvent and supercritical CO₂. *Bioresource technology* **2011**, *102* (21), 10151–10153. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.08.064.
- Chisti, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances* **2007**, *25* (3), 294–306. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2007.02.001.
- Chmiel, H. *Bioprozesstechnik*, 4. Auflage 2018; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2018.
- Cho, S.; Luong, T. T.; Lee, D.; Oh, Y.-K.; Lee, T. Reuse of effluent water from a municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biofuel production. *Bioresource technology* **2011**, *102* (18), 8639–8645. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.03.037.
- Citulski, J.; Farahbakhsh, K. Overcoming the toxicity effects of municipal wastewater sludge and biosolid extracts in the Yeast Estrogen Screen (YES) assay. *Chemosphere* **2012**, *87* (5), 498–503. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2011.12.043.
- Coldham, N. G.; Dave, M.; Sivapathasundaram, S.; McDonnell, D. P.; Connor, C.; Sauer, M. J. Evaluation of a recombinant yeast cell estrogen screening assay. *Environmental health perspectives* **1997**, *105* (7), 734–742. DOI: 10.1289/ehp.97105734.
- Da Fontoura, J. T.; Rolim, G. S.; Farenzena, M.; Gutterres, M. Influence of light intensity and tannery wastewater concentration on biomass production and nutrient removal by microalgae *Scenedesmus* sp. *Process Safety and Environmental Protection* **2017**, *111*, 355–362. DOI: 10.1016/j.psep.2017.07.024.
- Dasan, Y. K.; Lam, M. K.; Yusup, S.; Lim, J. W.; Lee, K. T. Life cycle evaluation of microalgae biofuels production: Effect of cultivation system on energy, carbon emission and cost balance analysis. *The Science of the total environment* **2019**, *688*, 112–128. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.06.181.
- Day, J. G.; Gong, Y.; Hu, Q. Microzooplanktonic grazers – A potentially devastating threat to the commercial success of microalgal mass culture. *Algal Research* **2017**, *27*, 356–365. DOI: 10.1016/j.algal.2017.08.024.
- Dillschneider, Robert. *Die Effizienz der Kultivierung von Mikroalgen zur Biodieselgewinnung - Prozessentwicklung auf der Grundlage von Energiebilanzierung, Simulation und Integration modellprädiktiver Regelungskonzepte*, 2014. DOI: 10.5445/IR/1000042024.
- Ding, T.; Li, W.; Yang, M.; Yang, B.; Li, J. Toxicity and biotransformation of bisphenol S in freshwater green alga *Chlorella vulgaris*. *The Science of the total environment* **2020**, *747*, 141144. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.141144.
- DWA. *Deutsche Vereinigung für Wasserwirtschaft, Abwasser und Abfall e. V., Entwurf Merkblatt DWA-M 731 Abwasser und Abfälle aus der Papierherstellung, Hennef.*, 2006.
- EU. Communication from the Commission to the Council and European Parliament, Community Strategy for Endocrine Disrupters (a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife).
- EU. Richtlinie 2008/105/EG des Europäischen Parlaments und des Rates, Über Umweltqualitätsnormen im Bereich der Wasserpolitik und zur Änderung und anschließenden Aufhebung der Richtlinien des Rates 82/176/EWG, 83/513/EWG, 84/156/EWG, 84/491/EWG und 86/280/EWG sowie zur Änderung der Richtlinie 2000/60/EG.
- Farooq, W.; Lee, Y.-C.; Ryu, B.-G.; Kim, B.-H.; Kim, H.-S.; Choi, Y.-E.; Yang, J.-W. Two-stage cultivation of two *Chlorella* sp. strains by simultaneous treatment of brewery wastewater and maximizing lipid productivity. *Bioresource technology* **2013**, *132*, 230–238. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.01.034.
- Figuroa, F. L.; Jerez, C. G.; Korbee, N. Use of in vivo chlorophyll fluorescence to estimate photosynthetic activity and biomass productivity in microalgae grown in different culture systems. *IJAR* **2013**, *41* (5), 801–819. DOI: 10.3856/vol41-issue5-fulltext-1.

- Forján, E.; Garbayo, I.; Henriques, M.; Rocha, J.; Vega, J. M.; Vilchez, C. UV-A mediated modulation of photosynthetic efficiency, xanthophyll cycle and fatty acid production of *Nannochloropsis*. *Marine biotechnology (New York, N.Y.)* **2011**, *13* (3), 366–375. DOI: 10.1007/s10126-010-9306-y.
- Fraunhofer IGB. Process development in photobioreactors - Fraunhofer IGB. <https://www.igb.fraunhofer.de/en/research/algae-biotechnology/process-development-in-photobioreactors.html> (accessed February 26, 2024).
- Gaido, K. W.; Leonard, L. S.; Lovell, S.; Gould, J. C.; Babai, D.; Portier, C. J.; McDonnell, D. P. Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicology and Applied Pharmacology* **1997**, *143* (1), 205–212. DOI: 10.1006/taap.1996.8069.
- García-Galán, M. J.; Gutiérrez, R.; Uggetti, E.; Matamoros, V.; García, J.; Ferrer, I. Use of full-scale hybrid horizontal tubular photobioreactors to process agricultural runoff. *Biosystems Engineering* **2018**, *166*, 138–149. DOI: 10.1016/j.biosystemseng.2017.11.016.
- Gattullo, C. E.; Bährs, H.; Steinberg, C. E. W.; Loffredo, E. Removal of bisphenol A by the freshwater green alga *Monoraphidium braunii* and the role of natural organic matter. *The Science of the total environment* **2012**, *416*, 501–506. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2011.11.033.
- GEA. Zentrifugalseparatoren. <https://www.gea.com/de/products/centrifuges-separation/centrifugal-separator/index.jsp> (accessed January 18, 2024).
- Genty, B.; Briantais, J.-M.; Baker, N. R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1989**, *990* (1), 87–92. DOI: 10.1016/S0304-4165(89)80016-9.
- Gouveia, L.; Oliveira, A. C. Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **2009**, *36* (2), 269–274. DOI: 10.1007/s10295-008-0495-6.
- Grummt, Tamara, Braunbeck, Thomas, Hollert, Henner, Kramer, Meike. *Leitfaden: Gefährdungsbasiertes Risikomanagement für anthropogene Spurenstoffe zur Sicherung der Trinkwasserversorgung (Tox Box). Modul Endokrine Wirkungen*, 2018.
- Guckert, J. B.; Cooksey, K. E.; Jackson, L. L. Lipid solvent systems are not equivalent for analysis of lipid classes in the microeukaryotic green alga, *Chlorella*. *Journal of Microbiological Methods* [Online] **1988**, *8* (3), 139–149. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0167701288900152>.
- Hadiyanto, H.; Widayat, W.; Cahyo Kumoro, A. Potency of Microalgae as Biodiesel Source in Indonesia. *Int. J. Renew. Energy Dev.* **2012**, *1* (1), 23–27. DOI: 10.14710/ijred.1.1.23-27.
- Halim, R.; Danquah, M. K.; Webley, P. A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnology advances* **2012**, *30* (3), 709–732. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2012.01.001.
- Halim, R.; Gladman, B.; Danquah, M. K.; Webley, P. A. Oil extraction from microalgae for biodiesel production. *Bioresource technology* **2011**, *102* (1), 178–185. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.06.136.
- Hamm, U., Kersten, A., Öller, H.-J., Kuwan, K., (Keine Angabe). *Endokrine Substanzen in Abwässern der Papierindustrie Teil 2. Abschlussbericht zum INFOR-Projekt 70*, 2008.
- Harris, E. H. CHLAMYDOMONAS AS A MODEL ORGANISM. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **2001**, *52*, 363–406. DOI: 10.1146/annurev.arplant.52.1.363.
- Held, Paul, Raymond, Keri. Determination of Algal Cell Lipids Using Nile Red: Using Microplates to Monitor Neutral Lipids in *Chlorella Vulgaris*. https://www.biotek.com/assets/tech_resources/Synergy_H4_Nile_Red_App_Note.pdf (accessed September 9, 2021).
- Hirooka, T.; Nagase, H.; Uchida, K.; Hiroshige, Y.; Ehara, Y.; Nishikawa, J.; Nishihara, T.; Miyamoto, K.; Hirata, Z. Biodegradation of bisphenol A and disappearance of its estrogenic activity by the green alga *Chlorella fusca* var. *vacuolata*. *Environmental toxicology and chemistry* **2005**, *24* (8), 1896–1901. DOI: 10.1897/04-259r.1.
- Hom-Díaz, A.; Llorca, M.; Rodríguez-Mozaz, S.; Vicent, T.; Barceló, D.; Blánquez, P. Microalgae cultivation on wastewater digestate: β -estradiol and 17α -ethynylestradiol degradation and transformation products

- identification. *Journal of environmental management* **2015**, *155*, 106–113. DOI: 10.1016/j.jenvman.2015.03.003.
- Institut für Hygiene und Umwelt. Wassergütemessnetz: Das Algentoximeter. <https://www.hamburg.de/hu/algentoximeter/> (accessed August 25, 2022).
- Javed, F.; Rehman, F.; Khan, A. U.; Fazal, T.; Hafeez, A.; Rashid, N. Real textile industrial wastewater treatment and biodiesel production using microalgae. *Biomass and Bioenergy* **2022**, *165*, 106559. DOI: 10.1016/j.biombioe.2022.106559.
- Ji, M.-K.; Kabra, A. N.; Choi, J.; Hwang, J.-H.; Kim, J. R.; Abou-Shanab, R. A.; Oh, Y.-K.; Jeon, B.-H. Biodegradation of bisphenol A by the freshwater microalgae *Chlamydomonas mexicana* and *Chlorella vulgaris*. *Ecological Engineering* **2014**, *73*, 260–269. DOI: 10.1016/j.ecoleng.2014.09.070.
- Karemore, A.; Sen, R. Green integrated process for mitigation of municipal and industrial liquid and solid waste mixes for enhanced microalgal biomass and lipid synthesis for biodiesel. *RSC Adv.* **2015**, *5* (87), 70929–70938. DOI: 10.1039/C5RA11670H.
- Kersten, A. *IGF-Abschlussbericht 15181. Untersuchungen zu Herkunft und Verbleib von endokrin wirksamen Substanzen bei der Papierherstellung und zum Potenzial für deren Abtrennung in Prozessen der Stoffaufbereitung*, 2009a.
- Kim, S.; Moon, M.; Kwak, M.; Lee, B.; Chang, Y. K. Statistical optimization of light intensity and CO₂ concentration for lipid production derived from attached cultivation of green microalga *Ettlia* sp. *Scientific reports* **2018**, *8* (1), 15390. DOI: 10.1038/s41598-018-33793-1.
- Knothe, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Processing Technology* [Online] **2005**, *86* (10), 1059–1070. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378382004001894>.
- Koller, M. Design of Closed Photobioreactors for Algal Cultivation. In *Algal Biorefineries*; Prokop, A., Bajpai, R. K., Zappi, M. E., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2015; pp 133–186. DOI: 10.1007/978-3-319-20200-6_4.
- Kuckelkorn, J.; Redelstein, R.; Heide, T.; Kunze, J.; Maletz, S.; Waldmann, P.; Grummt, T.; Seiler, T.-B.; Hollert, H. A hierarchical testing strategy for micropollutants in drinking water regarding their potential endocrine-disrupting effects-towards health-related indicator values. *Environmental science and pollution research international* **2018**, *25* (5), 4051–4065. DOI: 10.1007/s11356-017-0155-3.
- Kumar, P. C. S.; Viswanathan, A.; Mechery, J.; Mundakkal Thomas, D.; Puthenpurakkal Jacob, J.; Variyattel Paulose, S. Phycoremediation of Paper and Pulp Mill Effluent using *Planktochlorella nurekis* and *Chlamydomonas reinhardtii* – A Comparative Study. *Journal of Environmental Treatment Techniques* [Online] **2020**, No. 8, 809–817.
- Kurade, M. B.; Kim, J. R.; Govindwar, S. P.; Jeon, B.-H. Insights into microalgae mediated biodegradation of diazinon by *Chlorella vulgaris* : Microalgal tolerance to xenobiotic pollutants and metabolism. *Algal Research* **2016**, *20*, 126–134. DOI: 10.1016/j.algal.2016.10.003.
- Lam, M. K.; Lee, K. T. Potential of using organic fertilizer to cultivate *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Applied Energy* **2012**, *94*, 303–308. DOI: 10.1016/j.apenergy.2012.01.075.
- Larson, T. R.; Rees, T. A. V. CHANGES IN CELL COMPOSITION AND LIPID METABOLISM MEDIATED BY SODIUM AND NITROGEN AVAILABILITY IN THE MARINE DIATOM PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM (BACILLARIOPHYCEAE) 1. *Journal of Phycology* **1996**, *32* (3), 388–393. DOI: 10.1111/j.0022-3646.1996.00388.x.
- Laubenstein, S. Etablierung der Lipidextraktion und -analytik von im Technikumsmaßstab kultivierten Mikroalgen. Masterarbeit; Hochschule Darmstadt, Darmstadt, 2022.

- Lazer L. Struktur und Funktion mikrobieller Populationen bei der Aufbereitung von Industrieabwasser. Dissertation; Hamburg Universität, Hamburg, 2017.
- Lee, A. K.; Lewis, D. M.; Ashman, P. J. Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements. *Biomass and Bioenergy* **2012**, *46*, 89–101. DOI: 10.1016/j.biombioe.2012.06.034.
- Lee, S.-A.; Lee, N.; Oh, H.-M.; Ahn, C.-Y. Enhanced and Balanced Microalgal Wastewater Treatment (COD, N, and P) by Interval Inoculation of Activated Sludge. *Journal of microbiology and biotechnology* **2019**, *29* (9), 1434–1443. DOI: 10.4014/jmb.1905.05034.
- Lei, A. P.; Wong, Y. S.; Tam, N. Removal of pyrene by different microalgal species. *Water Science and Technology* **2002**, *46* (11-12), 195–201. DOI: 10.2166/wst.2002.0738.
- Li, R.; Chen, G.-Z.; Tam, N. F. Y.; Luan, T.-G.; Shin, P. K. S.; Cheung, S. G.; Liu, Y. Toxicity of bisphenol A and its bioaccumulation and removal by a marine microalga *Stephanodiscus hantzschii*. *Ecotoxicology and environmental safety* **2009**, *72* (2), 321–328. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2008.05.012.
- Lürding, M. Phenotypic plasticity in the green algae *Desmodesmus* and *Scenedesmus* with special reference to the induction of defensive morphology. *Ann. Limnol. - Int. J. Lim.* **2003**, *39* (2), 85–101. DOI: 10.1051/limn/2003014.
- Mahapatra, D. M.; Ramachandra, T. V. Algal biofuel: bountiful lipid from *Chlorococum* sp. proliferating in municipal wastewater. *Current Science [Online]* **2013**, No. 105, 47–55.
- Malsi, C. Untersuchung des Einflusses von Licht unterschiedlicher Wellenlängen auf die Lipidbildung von Mikroalgen. Masterarbeit; Hochschule Darmstadt, Darmstadt, 2022.
- Maltsev, Y.; Maltseva, K.; Kulikovskiy, M.; Maltseva, S. Influence of Light Conditions on Microalgae Growth and Content of Lipids, Carotenoids, and Fatty Acid Composition. *Biology* **2021**, *10* (10). DOI: 10.3390/biology10101060.
- Mata, T. M.; Martins, A. A.; Caetano, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews [Online]* **2010**, *14* (1), 217–232. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032109001646>.
- Möbius C.-H. *Abwasser der Papier- und Zellstoffindustrie (Wastewater of pulp and paper industry)* Version 5.02, 2017.
- Montemezzani, V.; Duggan, I. C.; Hogg, I. D.; Craggs, R. J. A review of potential methods for zooplankton control in wastewater treatment High Rate Algal Ponds and algal production raceways. *Algal Research* **2015**, *11*, 211–226. DOI: 10.1016/j.algal.2015.06.024.
- Mujtaba, G.; Choi, W.; Lee, C.-G.; Lee, K. Lipid production by *Chlorella vulgaris* after a shift from nutrient-rich to nitrogen starvation conditions. *Bioresource technology* **2012**, *123*, 279–283. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.07.057.
- Musharraf, S. G.; Ahmed, M. A.; Zehra, N.; Kabir, N.; Choudhary, M. I.; Rahman, A.-U. Biodiesel production from microalgal isolates of southern Pakistan and quantification of FAMES by GC-MS/MS analysis. *Chemistry Central journal* **2012**, *6* (1), 149. DOI: 10.1186/1752-153X-6-149.
- Nagi, M.; He, M.; Li, D.; Gebreluel, T.; Cheng, B.; Wang, C. Utilization of tannery wastewater for biofuel production: New insights on microalgae growth and biomass production. *Sci Rep [Online]* **2020**, *10* (1), 1530. <https://www.nature.com/articles/s41598-019-57120-4>.
- Oostlander, P. C.; van Houcke, J.; Wijffels, R. H.; Barbosa, M. J. Microalgae production cost in aquaculture hatcheries. *Aquaculture* **2020**, *525*, 735310. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2020.735310.
- Pacheco, D.; Rocha, A. C. S.; Garcia, A.; Bóia, A.; Pereira, L.; Verdelhos, T. Municipal Wastewater: A Sustainable Source for the Green Microalgae *Chlorella vulgaris* Biomass Production. *Applied Sciences* **2021**, *11* (5), 2207. DOI: 10.3390/app11052207.

- Panahi, Y.; Yari Khosroushahi, A.; Sahebkar, A.; Heidari, H. R. Impact of Cultivation Condition and Media Content on *Chlorella vulgaris* Composition. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* **2019**, *9* (2), 182–194. DOI: 10.15171/apb.2019.022.
- Peng, F.-Q.; Ying, G.-G.; Yang, B.; Liu, Y.-S.; Lai, H.-J.; Zhou, G.-J.; Chen, J.; Zhao, J.-L. Biotransformation of the flame retardant tetrabromobisphenol-A (TBBPA) by freshwater microalgae. *Environmental toxicology and chemistry* **2014**, *33* (8), 1705–1711. DOI: 10.1002/etc.2589.
- Pinnekamp, J. *Einsatz weitergehender Reinigungstechnologien zur Verringerung der CSB-Belastung und Abwasserrückführung bei der Produktion von Hygienepapieren bei der Firma WEPA. Abschlussbericht zum Forschungsvorhaben für das Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen, Aachen, 2007.*
- Pinto, G.; Pollio, A.; Previtera, L.; Temussi, F. Biodegradation of phenols by microalgae. *Biotechnology Letters* **2002**, *24* (24), 2047–2051. DOI: 10.1023/A:1021367304315.
- Posten, C. Discovering Microalgae as Source for Sustainable Biomass. In *Microalgal biotechnology*; Posten, C., Ed.; deGruyter: Berlin, 2012; pp 1–8. DOI: 10.1515/9783110225020.1.
- Prastija, N. D. Untersuchungen zur Lipid- und Chlorophyllproduktion in *Microchloropsis salina*-Kulturen und Astaxanthinproduktion in *Haematococcus pluvialis*-Kulturen unter Stressbedingungen in Airlift-Reaktoren. Bachelorarbeit; Hochschule Darmstadt, Darmstadt, 2019.
- Putri, D. S.; Astuti, S. P.; Alaa, S. The growth of microalgae *Chlorococcum* sp. isolated from Ampenan estuary of Lombok Island in Walne's medium. In *PROCEEDINGS OF THE 2ND INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOSCIENCE, BIOTECHNOLOGY, AND BIOMETRICS 2019*; AIP Publishing, 2019; p 50003. DOI: 10.1063/1.5141301.
- Ras, M.; Steyer, J.-P.; Bernard, O. Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production. *Rev Environ Sci Biotechnol* **2013**, *12* (2), 153–164. DOI: 10.1007/s11157-013-9310-6.
- Rayati, M.; Rajabi Islami, H.; Shamsaie Mehrgan, M. Light Intensity Improves Growth, Lipid Productivity, and Fatty Acid Profile of *Chlorococcum oleofaciens* (Chlorophyceae) for Biodiesel Production. *Bioenerg. Res.* **2020**, *13* (4), 1235–1245. DOI: 10.1007/s12155-020-10144-5.
- Ren, H.-Y.; Liu, B.-F.; Kong, F.; Zhao, L.; Ren, N.-Q. Improved Nile red staining of *Scenedesmus* sp. by combining ultrasonic treatment and three-dimensional excitation emission matrix fluorescence spectroscopy. *Algal Research* **2015**, *7*, 11–15. DOI: 10.1016/j.algal.2014.11.007.
- Ren, X.; Zhao, X.; Turcotte, F.; Deschênes, J.-S.; Tremblay, R.; Jolicoeur, M. Current lipid extraction methods are significantly enhanced adding a water treatment step in *Chlorella protothecoides*. *Microbial cell factories* **2017**, *16* (1), 26. DOI: 10.1186/s12934-017-0633-9.
- Richards, C.; O'Connor, N.; Jose, D.; Barrett, A.; Regan, F. Selection and optimization of protein and carbohydrate assays for the characterization of marine biofouling. *Anal. Methods* **2020**, *12* (17), 2228–2236. DOI: 10.1039/d0ay00272k.
- Robles Medina, A.; Molina Grima, E.; Giménez Giménez, A.; Ibañez González, M. J. Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids. *Biotechnology advances* [Online] **1998**, *16* (3), 517–580. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975097000839>.
- Rocuzzo, S.; Beckerman, A. P.; Trögl, J. New perspectives on the bioremediation of endocrine disrupting compounds from wastewater using algae-, bacteria- and fungi-based technologies. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **2021**, *18* (1), 89–106. DOI: 10.1007/s13762-020-02691-3.
- Rugnini, L.; Rossi, C.; Antonaroli, S.; Rakaj, A.; Bruno, L. The Influence of Light and Nutrient Starvation on Morphology, Biomass and Lipid Content in Seven Strains of Green Microalgae as a Source of Biodiesel. *Microorganisms* **2020**, *8* (8). DOI: 10.3390/microorganisms8081254.

- Safarian, M. S.; Faramarzi, M. A.; Amini, M.; Soltani, N.; Tabatabaei-Sameni, M.; Hasan-Beikdashti, M. Microalgal transformation of progesterone by the terrestrial-isolated cyanobacterium *Microchaete tenera*. *J Appl Phycol* **2012**, *24* (4), 777–781. DOI: 10.1007/s10811-011-9697-9.
- Sanusi, A. I. Optimal Complementary Wastewater Mixture for *Chlorococcum* Sp. Cultivation: Biomass Production, Lipid Accumulation and Wastewater Remediation Studies. *SSRN Journal* [Online] **2022**.
- Saranya, D.; Shanthakumar, S. Green microalgae for combined sewage and tannery effluent treatment: Performance and lipid accumulation potential. *Journal of environmental management* **2019**, *241*, 167–178. DOI: 10.1016/j.jenvman.2019.04.031.
- Schenk, P. M.; Thomas-Hall, S. R.; Stephens, E.; Marx, U. C.; Mussgnug, J. H.; Posten, C.; Kruse, O.; Hankamer, B. Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *Bioenerg. Res.* [Online] **2008**, *1* (1), 20–43. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12155-008-9008-8>.
- Schmid-Staiger, Ulrike, Holdmann, Claudia, Rippliner, Peter, Wach, Wolfgang. *Bioraffinerie auf Basis kohlenhydratreicher Algenbiomasse, Nutzung von Stärke und Protein: Schlussbericht*. https://www.igb.fraunhofer.de/content/dam/igb/documents/publications/berichte/2016/2016_Algen_Bioraffinerie.pdf (accessed October 20, 2022).
- Schott. Photobioreaktoren. <https://www.schott.com/de-at/expertise/anwendungen/photobioreaktoren> (accessed February 26, 2024).
- Schröter-Schlaack, Christoph, Aicher, Christoph, Grünwald, Reinhard, Revermann, Christoph, Schiller, Johannes. *Das Potenzial algenbasierter Kraftstoffe für den Lkw-Verkehr. Sachstandsbericht zum Monitoring »Nachhaltige Potenziale der Bioökonomie – Biokraftstoffe der 3. Generation«*, 2019. DOI: 10.5445/IR/1000103781.
- Sethunathan, N.; Megharaj, M.; Chen, Z. L.; Williams, B. D.; Lewis, G.; Naidu, R. Algal degradation of a known endocrine disrupting insecticide, alpha-endosulfan, and its metabolite, endosulfan sulfate, in liquid medium and soil. *Journal of agricultural and food chemistry* **2004**, *52* (10), 3030–3035. DOI: 10.1021/jf035173x.
- Shi, W.; Wang, L.; Rousseau, D. P. L.; Lens, P. N. L. Removal of estrone, 17alpha-ethinylestradiol, and 17beta-estradiol in algae and duckweed-based wastewater treatment systems. *Environmental science and pollution research international* **2010**, *17* (4), 824–833. DOI: 10.1007/s11356-010-0301-7.
- Singh, R.; Behera, M.; Kumar, S.; Rani, A. Current State of Knowledge on Algae-Mediated Remediation of Endocrine-Disrupting Chemicals (EDCs) from Wastewater. In *Application of Microalgae in Wastewater Treatment. Volume 1: Domestic and Industrial Wastewater Treatment*, Gupta, S. K., Bux, F., Eds.; Springer eBooks Earth and Environmental Science; Springer: Cham, 2019; pp 101–120. DOI: 10.1007/978-3-030-13913-1_6.
- Singh, S. P.; Singh, P. Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2015**, *50*, 431–444. DOI: 10.1016/j.rser.2015.05.024.
- Solovchenko, A. E.; Chivkunova, O. B.; Maslova, I. P. Pigment composition, optical properties, and resistance to photodamage of the microalga *Haematococcus pluvialis* cultivated under high light. *Russ J Plant Physiol* [Online] **2011**, *58* (1), 9–17. <https://link.springer.com/article/10.1134/S1021443710061056>.
- Srinivas, R.; Ochs, C. Effect of UV-A irradiance on lipid accumulation in *Nannochloropsis oculata*. *Photochemistry and photobiology* **2012**, *88* (3), 684–689. DOI: 10.1111/j.1751-1097.2012.01091.x.
- Tan, X.-B.; Yang, L.-B.; Zhang, Y.-L.; Zhao, F.-C.; Chu, H.-Q.; Guo, J. *Chlorella pyrenoidosa* cultivation in outdoors using the diluted anaerobically digested activated sludge. *Bioresource technology* **2015**, *198*, 340–350. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.09.025.
- Tao, R.; Kinnunen, V.; Praveenkumar, R.; Lakaniemi, A.-M.; Rintala, J. A. Comparison of *Scenedesmus acuminatus* and *Chlorella vulgaris* cultivation in liquid digestates from anaerobic digestion of pulp and paper industry and municipal wastewater treatment sludge. *J Appl Phycol* **2017**, *29* (6), 2845–2856. DOI: 10.1007/s10811-017-1175-6.

- Tarlan, E.; Dilek, F. B.; Yetis, U. Effectiveness of algae in the treatment of a wood-based pulp and paper industry wastewater. *Bioresource technology* **2002**, *84* (1), 1–5. DOI: 10.1016/s0960-8524(02)00029-9.
- Tejido-Nuñez, Y.; Aymerich, E.; Sancho, L.; Refardt, D. Treatment of aquaculture effluent with *Chlorella vulgaris* and *Tetrademus obliquus*: The effect of pretreatment on microalgae growth and nutrient removal efficiency. *Ecological Engineering* **2019**, *136*, 1–9. DOI: 10.1016/j.ecoleng.2019.05.021.
- Uggetti, E.; García, J.; Álvarez, J. A.; García-Galán, M. J. Start-up of a microalgae-based treatment system within the biorefinery concept: from wastewater to bioproducts. *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research* **2018**, *78* (1-2), 114–124. DOI: 10.2166/wst.2018.195.
- Umweltbundesamt. *Leitfaden Nachhaltige Chemikalien: Eine Entscheidungshilfe für Stoffhersteller, Formulierer und Endanwender von Chemikalien*, 2016.
- Usha, M. T.; Sarat Chandra, T.; Sarada, R.; Chauhan, V. S. Removal of nutrients and organic pollution load from pulp and paper mill effluent by microalgae in outdoor open pond. *Bioresource technology* **2016**, *214*, 856–860. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.04.060.
- van Wagenen, J.; Miller, T. W.; Hobbs, S.; Hook, P.; Crowe, B.; Huesemann, M. Effects of Light and Temperature on Fatty Acid Production in *Nannochloropsis Salina*. *Energies* **2012**, *5* (3), 731–740. DOI: 10.3390/en5030731.
- Vázquez-Romero, B.; Perales, J. A.; Pereira, H.; Barbosa, M.; Ruiz, J. Techno-economic assessment of microalgae production, harvesting and drying for food, feed, cosmetics, and agriculture. *The Science of the total environment* **2022**, *837*, 155742. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.155742.
- Volkman, J. K.; Brown, M. R.; Dunstan, G. A.; Jeffrey, S. W. THE BIOCHEMICAL COMPOSITION OF MARINE MICROALGAE FROM THE CLASS EUSTIGMATOPHYCEAE 1. *Journal of Phycology* **1993**, *29* (1), 69–78. DOI: 10.1111/j.1529-8817.1993.tb00281.x.
- Wang, S.; Poon, K.; Cai, Z. Biodegradation and removal of 3,4-dichloroaniline by *Chlorella pyrenoidosa* based on liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. *Environmental science and pollution research international* **2013a**, *20* (1), 552–557. DOI: 10.1007/s11356-012-0995-9.
- Wang, S.; Wang, X.; Poon, K.; Wang, Y.; Li, S.; Liu, H.; Lin, S.; Cai, Z. Removal and reductive dechlorination of triclosan by *Chlorella pyrenoidosa*. *Chemosphere* **2013b**, *92* (11), 1498–1505. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2013.03.067.
- Weinberger, Gabriele, Bienert, Christian, Pell, Ludmilla, Wieczorek, Nils, Kuchta, Kerstin. PTS-Forschungsbericht IGF 83 EBG. „Grüne“ Abwasserreinigung mit energetischer Nutzung von symbiotisch interagierender Algen-Bleibtschlamm-Biomasse (ALBAPRO). https://www.ptspaper.de/fileadmin/PTS/PTSPAPER/06_Forschung/Dokumente/Forschungsprojekte/EU_ALBAPRO.pdf (accessed December 14, 2022).
- Weßel, C., Brabender, K., Öller, H.-J., Preidl, M. *Wasser- und Reststoffumfrage der deutschen Zellstoff- und Papierindustrie*, 2022.
- Wu, L. F.; Chen, P. C.; Huang, A. P.; Lee, C. M. The feasibility of biodiesel production by microalgae using industrial wastewater. *Bioresource technology* **2012**, *113*, 14–18. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.12.128.
- Xu, L.; Cheng, X.; Wang, Q. Enhanced Lipid Production in *Chlamydomonas reinhardtii* by Co-culturing With *Azotobacter chroococcum*. *Frontiers in plant science* **2018**, *9*, 741. DOI: 10.3389/fpls.2018.00741.
- Yang, F.; Xiang, W.; Li, T.; Long, L. Transcriptome analysis for phosphorus starvation-induced lipid accumulation in *Scenedesmus* sp. *Scientific reports* **2018**, *8* (1), 16420. DOI: 10.1038/s41598-018-34650-x.
- Yang, S.; Wu, R. S. S.; Kong, R. Y. C. Biodegradation and enzymatic responses in the marine diatom *Skeletonema costatum* upon exposure to 2,4-dichlorophenol. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)* **2002**, *59* (3-4), 191–200. DOI: 10.1016/s0166-445x(01)00252-1.
- Yeh, K.-L.; Chang, J.-S. Nitrogen starvation strategies and photobioreactor design for enhancing lipid content and lipid production of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31: implications for biofuels. *Biotechnology journal* **2011**, *6* (11), 1358–1366. DOI: 10.1002/biot.201000433.

-
- Zhang, Y.; Habteselassie, M. Y.; Resurreccion, E. P.; Mantripragada, V.; Peng, S.; Bauer, S.; Colosi, L. M. Evaluating Removal of Steroid Estrogens by a Model Alga as a Possible Sustainability Benefit of Hypothetical Integrated Algae Cultivation and Wastewater Treatment Systems. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2014**, *2* (11), 2544–2553. DOI: 10.1021/sc5004538.
- Zhang, Y.; Ren, L.; Chu, H.; Zhou, X.; Yao, T.; Zhang, Y. Optimization for *Scenedesmus obliquus* Cultivation: the Effects of Temperature, Light Intensity and pH on Growth and Biochemical Composition. *Microbiology and Biotechnology Letters* **2019**, *47* (4), 614–620. DOI: 10.4014/mbi.1906.06005.
- Zhang, Y.; Shen, H.; Zhong, P.; Huang, Z.; Xu, N.; Li, A. Two-stage cultivation of *Scenedesmus acuminatus* with nitrogen and sulfur for growth and lipid accumulation. *J Appl Phycol* **2022**, *34* (4), 1871–1880. DOI: 10.1007/s10811-022-02777-0.
- Zhang, Y.; Wu, H.; Sun, M.; Peng, Q.; Li, A. Photosynthetic physiological performance and proteomic profiling of the oleaginous algae *Scenedesmus acuminatus* reveal the mechanism of lipid accumulation under low and high nitrogen supplies. *Photosynthesis research* [Online] **2018**, *138* (1), 73–102. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30039359/>.
- Zheng, H.; Yin, J.; Gao, Z.; Huang, H.; Ji, X.; Dou, C. Disruption of *Chlorella vulgaris* cells for the release of biodiesel-producing lipids: a comparison of grinding, ultrasonication, bead milling, enzymatic lysis, and microwaves. *Applied biochemistry and biotechnology* **2011**, *164* (7), 1215–1224. DOI: 10.1007/s12010-011-9207-1.