Einsatz der Mikroalge *Pavlova* spec. als alternatives Futtermittel für die Larvenaufzucht in der marinen Aquakultur

DBU AZ 28183-34

Endbericht

15.03.2014

1 Projektverlauf 4

2 Material und Methoden 6

2.1 *Pavlova*-Arten 6

2.2 Meßtechniken 6

2.2.1 Bestimmung des Yields 6

2.2.2 Bestimmung der Optischen Dichte (OD) 6

2.2.3 Bestimmung der Biologischen Trockenmasse (BTM) 6

2.2.4 Bestimmung der Zellzahl 6

2.2.5 Analyse von EPA und DHA 7

2.3 Genutzte Phtotobioreaktoren 7

2.3.1 2-Liter-Photbioreaktoren (Laborversuche) 7

2.3.2 Upscale-Versuch mit P. *viridis* in der Glasröhrenanlage 7

2.3.3 Versuche in der Technikumshalle am Maricube, Büsum 8

2.3.4 Versuche im Gewächshaus 8

3 Ergebnisse 10

3.1 Allgemeines zu den *Pavlova*-Arten 10

3.2 2-Liter Photobioreaktoren 10

3.2.1 Experimente zur Ermittlung der Temperaturtoleranzen der verschiedenen *Pavlova*-Arten 10

3.2.1.1 P. lutheri (SAG-926-1) 10

3.2.1.2 *Pavlova viridis* 12

3.2.1.3 *P. viridis* (Wiederholungsversuch) 13

3.2.1.4 *Pavlova sp.* – CCMP 1228 16

3.2.1.5 *Pavlova sp.* – CCMP 459 18

3.2.1.6 *P. pinguis* – CCMP 609 21

3.2.2 Zusammenfassung der Temperaturversuche 22

3.2.3 Untersuchungen zur Fettsäuresynthese unter gleichen Temperaturbedingungen 23

3.2.4 Experimente zu den Nährstoffbedürfnissen ausgewählter *Pavlova*-Arten 25

3.2.4.1 Einfluss der Vitaminverfügbarkeit auf CCMP 1228 und P. *viridis* 25

3.2.4.2 P. *viridis* – erneuter Vitaminversuch 27

3.2.4.3 CCMP 1228 – erneuter Vitaminversuch 28

3.2.4.4 Versuche zur Stickstofflimitierung mit P. *viridis* und CCMP 1228 30

3.2.4.5 Versuch zur Stickstofflimitierung bei *P. viridis* 31

3.3 Upscalen der *Pavlova viridis* Versuche auf 250 Liter Reaktoren 34

3.3.1 Allgemeines zu den großvolumigen Versuchen 35

3.3.2 Maximal erreichte Biomassen 36

3.3.3 Wachstumsraten im Vergleich: *P. viridis* zu *Nannochloropsis sp.* 38

4 Ernte und Re-start der Bioreaktoren 39

Sedimentation 39

Flokkulation 39

Zentrifugation 40

Filtration 40

5 Kultivierung von Lebendfutterorganismen (*Brachionus plicatilis*) 41

6 Fischlarvenernährung 45

7 Mikroalgen im Fischfutter 49

8 Produktentwicklung 52

9 Diskussion 53

10 Öffentlichkeitsarbeit 54

11 Fazit 54

1 Projektverlauf

Das Projekt lief über drei Jahre (15.03.2010-15.03.2013) und wurde in einer Gemeinschaftsarbeit von Forschungs- und Technologiezentrum Westküste (FTZ), BlueBioTech GmbH (BBT) und der Gesellschaft für marine Aquakultur (GMA) durchgeführt. Ziel war es *Pavlova* -Algen als Futter für die Aquakultur zu entwickeln und im großen Maßstab zu produzieren. *Pavlova* ist insofern für die Aquakultur interessant, da sie zu den wenigen Mikroalgen gehört, die die beiden mehrfach ungesättigten Fettsäuren EPA und DHA synthetisiert (diese sind für die Aufzucht von Fischlarven wichtig). Außerdem hat *Pavlova* eine Zellgröße, die für die Fütterung von Futtertieren (Copepoden oder Rotifera) und Fischlarven optimal ist.

Im ersten Projektabschnitt wurden praxisrelevante Kultivierungsparameter für die *Pavlova*-Produktion im Gewächshaus definiert. Dabei wurden insbesondere Mittelwerte sowie Schwankungsbreiten der Parameter Temperatur und Lichtintensität aus der langjährigen Produktion von *Nannochloropsis* in Gewächshäusern bestimmt.
Aus diesen Datensätzen leiteten sich die Vorgaben für die Kultivierungsexperimente im Labor und in der Technikumsanlage ab. Parallel dazu wurden die aus der wissenschaftlichen Literatur bereits vorhandenen Daten (u.a. Zhou et al., 2007; Ponis et al., 2008; Ramirez et al., 2008) genutzt, um verschiedene *Pavlova*-Stämme hinsichtlich ihrer biotechnologischen Kultivierungspotentiale einschätzen zu können. Entsprechend geeignete Stämme wurden angeschafft und in Kultur genommen.
Mit den ausgewählten Arten wurden zunächst umfangreiche Laborexperimente durchgeführt, in denen Temperaturoptimum und -maximum, Nährstoff- und Lichtbedürfnisse der einzelnen Arten ermittelt wurden. Parallel dazu wurden die unterschiedlichen Arten auf ihren Fettsäuregehalt bzw. dessen Änderungen in Abhängigkeit der Kultivierungsbedingungen hin untersucht.
Basierend auf den Ergebnissen der Laboranalysen und der Kultivierungsexperimente wurde die für die großtechnische Produktion am geeignetsten erscheinende *Pavlova*-Art ermittelt und in der nächsten Projektphase im produktionsnahen Technikumsmaßstab (RPBS; 4 Reaktoren mit einem Arbeitsvolumen von je 250L) kultiviert. Bei diesen Experimenten standen Optimierungsschritte hinsichtlich verfahrenstechnischer Aspekte der Prozessführungsstrategien als auch Ernte-, Aufarbeitungs- und Konservierungstechniken der produzierten Biomasse im Vordergrund. Die weiterhin parallel durchgeführten Laboranalysen sollten zur Überprüfung der zellulären Fettsäurekonzentration des ausgesuchten *Pavlova*-Stamms dienen.
Um eine schonende Ernte und marktorientierte Produktformulierung zu gewährleisten, wurden mit der Algenbiomasse aus den 250L RPBS verschiedene Erntemethoden (Filtration, Zentrifugation, Sedimentation) durchgeführt. Anhand mikroskopischer und physiologischer Daten wurde die Qualität der geernteten Algenbiomasse beurteilt und die Prozesse entsprechend optimiert.
Nach Ermittlung einer geeigneten Erntemethode wurde die aufkonzentrierte Algenbiomasse anschließend durch verschiedene Verfahren haltbar gemacht um ein marktfähiges Produkt zu erhalten. Dabei wurde die Haltbarkeit der Algenbiomasse gekühlt, bei verschiedenen Temperaturen eingefroren und gefriergetrocknet untersucht.

Im Anschluss wurden *Brachionus* sp. mit definierten Zellmengen an *Pavlova* sp. aus den unterschiedlich verarbeiteten Produkten angereichert.
Im letzten Abschnitt des Projektes wurden - anhand der Vorgaben aus der Literatur und der Ergebnisse aus den Kultivierungsexperimenten - Photobioreaktoren für den Betrieb im Gewächshaus entwickelt. Dabei mussten die generellen Charakteristika der *Pavlova*-Zellen berücksichtigt werden. Zum einen musste eine strömungsintensive Durchmischung gewährleistet werden, um eine Sedimentation der Algenzellen zu vermeiden. Andererseits musste die Durchmischung scherkraftarm gewährleistet werden, um eine Schädigung der scherkraftempfindlichen Algenzellen zu vermeiden.

2 Material und Methoden

2.1 *Pavlova*-Arten

Die fünf verwendeten *Pavlova*-Arten wurden bei folgenden Algenkultursammlungen bestellt:

Pavlova lutheri (strain-Nr.: SAG 962-1) → Sammlung von Algenkulturen (SAG) Göttingen, Deutschland

Pavlova sp. (strain-Nr.: CCMP 1228) → National Centre for marine Algae and Microbiota, USA

Pavlova sp. (strain-Nr.: CCMP 459) → National Centre for marine Algae and Microbiota, USA

Pavlova pinguis (strain-Nr.: CCMP 609) → National Centre for marine Algae and Microbiota, USA

Pavlova viridis → Institute of Oceanology, Quingdao, Shandong, China

Alle fünf Arten wurden in 2f Medium (nach Guillard and Ryther, 1962) kultiviert.

2.2 Meßtechniken

2.2.1 Bestimmung des Yields

Der Yield ist ein Maß für die Effizienz der Photosynthese der Algen. Ein hoher Yield zeigt eine gute Ausnutzung des Lichtes durch die Photosynthese der Algen an. Ein Yield nahe Null deutet auf Mangelerscheinungen der Algen hin, da die Photosynthese nicht mehr optimal arbeitet. Die Messung erfolgt mittels des PAM-Gerätes der Firma Waltz (Effeltrich, D).

2.2.2 Bestimmung der Optischen Dichte (OD)

Die optische Dichte einer Probe (3 ml) wurde mit einem Sprectrophotometer (U-1100, HITACHI, Tokyo, J) bei 750 nm gemessen. Dabei ist die gemessene Extinktion ein Maß für die Zelldichte der jeweiligen Kultur: je mehr Zellen, desto höher der OD-Wert.

2.2.3 Bestimmung der Biologischen Trockenmasse (BTM)

Für die Bestimmung der Biologischen Trockenmasse wurden 2 ml der jeweiligen Probe über einen vorgeglühten und gewogenen Mikrofilter (GF/C, Whatman, Brentfort, UK) filtriert, für 24 Stunden bei 104°C getrocknet und anschließend erneut gewogen. Die Differenz der Wägungen wurde zur Berechnung der BTM genutzt. Je Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

2.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl der Proben wurde mikroskopisch mit Hilfe einer Zählkammer von Fuchs-Rosenthal (0,2mm Tiefe, 0,0625 mm^2 Fläche) durchgeführt. Die beweglichen Zellen von *Pavlova* wurden zuvor mit Lugol fixiert.

2.2.5 Analyse von EPA und DHA

Die quantitative und qualitative Bestimmung der Fettsäuren erfolgte anhand der von Garces und Mancha (1993) angegebenen Methylierungsmethode mit Hilfe der Gaschromatographie. Die eigentliche gaschromatographische Analyse wurde mit einem Gaschromatographen (GC-14B, Shimadzu, Kyoto, J (mit einer Kapillarsäule, FS-CW 20M-CB) durchgeführt.

2.3 Genutzte Phtotobioreaktoren

2.3.1 2-Liter-Photbioreaktoren (Laborversuche)

Die Versuche zur Temperaturtoleranz und zur Stickstofflimitierung wurden in einem in Abb. 1 schematisch dargestellten Versuchsaufbau durchgeführt. Es handelt sich um vier identische 2-Liter-Photobioreaktoren, deren Temperatur und pH-Wert (8,3) elektronisch überwacht und geregelt wurden. Licht wurde mittels seitlich installierter Leuchtstoffröhren im 12h:12h Hell-Dunkel-Rhythmus gegeben. Die Temperatur wurde über Heizplatten bzw. Kühlschläuche eingestellt.

Die Vitaminversuche wurden in 500ml Photobioreaktoren durchgeführt.

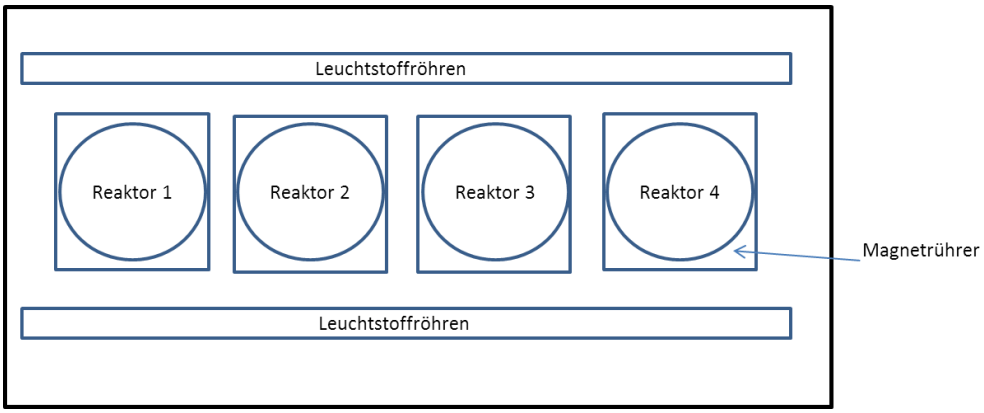

Abb. 1 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaues mit den 2-Liter-Photobioreaktoren

2.3.2 Upscale-Versuch mit P. *viridis* in der Glasröhrenanlage

Ein upscale-Versuch mit einer der vielversprechendsten *Pavlova*-Arten wurde in einem am Forschungs- und Technologiezentrum vorhandenen 250-Liter Photobioreaktor (vgl. Abb. 2) durchgeführt.

Der pH-Wert wurde messtechnisch auf 8,3 geregelt, das Licht wurde mittels Leuchtstoffröhren in einem 12h:12h Hell-Dunkelrhythmus gegeben. Eine Temperaturregelung war nicht möglich; aufgrund des Standortes der Anlage hatte die Kultur aber eine annähernd gleichmäßige Temperatur von ca. 20°C.

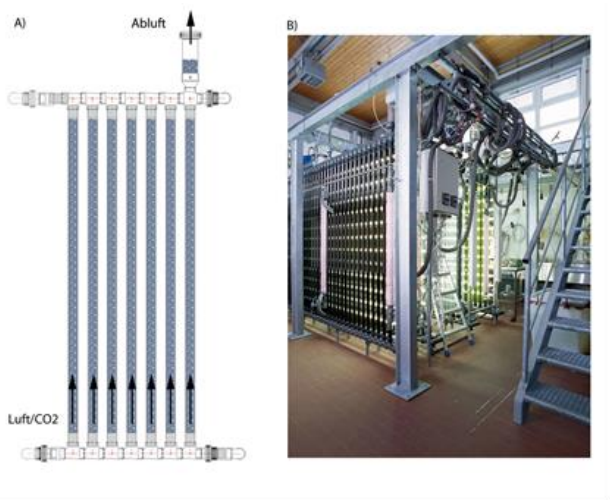

Abb. 2 Glasröhrenanlage (4 x 250 Liter), FTZ Westküste, Büsum

2.3.3 Versuche in der Technikumshalle am Maricube, Büsum

Weitere großvolumige Versuche wurden in der Technikumshalle von BBT durchgeführt. Die Bioreaktoren aus PE-Material hatten ein Fassungsvolumen von 20 bzw. 350 Litern.

Das Licht wurde in einem 12h:12h Hell: Dunkelrhythmus mittels direkt vor den Bioreaktoren angebrachten Leuchtstoffröhren (58 Watt) gegeben. Die Temperatur wurde nicht geregelt, sondern über die Temperatur der Hallenluft bestimmt (zwischen 16°C und 26°C). Der pH-Wert wurde über die geregelte Zugabe von CO_2 zur Begasungsluft auf 8,3 eingestellt.

2.3.4 Versuche im Gewächshaus

Im letzten Jahr des Projektes wurden die geeignetsten *Pavlova*-Arten annähernd unter Freilandbedingungen kultiviert. Dabei befanden sich die Bioreaktoren in einem Gewächshaus, so dass Licht und Temperatur den Bedingungen im Freiland glichen.

Als Bioreaktoren kamen erneut Reaktoren aus PE-Material zum Einsatz und ein Raceway mit 1000 Liter Fassungsvermögen.

Die Beleuchtung erfolgte ausschließlich über Tageslicht, wobei bei zu starker Erwärmung der Algenkulturen durch das Sonnenlicht die Bioreaktoren beschattet wurden (30% Restlicht).

Es erfolgte keine Temperaturregelung, so dass die Kulturen tagesperiodischen Temperaturschwankungen unterworfen waren. Zudem wurde die Temperatur auch durch Wetter und Jahreszeit beeinflusst. Ab einer Temperatur der Kulturen von 32°C wurden die PE-Reaktoren

nicht nur beschattet, sondern zusätzlich über die Vernebelung von Wasser und die damit einhergehende Verdunstungskälte gekühlt (diese Maßnahme kam für den nach oben offenen Raceway nicht zum Einsatz). Im Sommer 2013 wurde trotz dieser Maßnahmen an einigen Tagen in den Kulturen ein Temperaturmaximum von 36°C erreicht.

Abb. 3 PE-Säcke (Volumen: 20 Liter) als Bioreaktoren für drei unterschiedliche *Pavlova*-Arten (v.l.n.r.: *P. viridis*, CCMP 1228, CCMP 609)

Der pH-Sollwert wurde über die geregelte Zugabe von CO_2 zur Begasungsluft auf 8,3 eingestellt.

Die notwendige Durchmischung der Kulturen (um ein Absinken der Algenzellen zu verhindern) wurde in allen Reaktoren - außer dem raceway - durch die Begasung gewährleistet. Beim raceway wurde das Medium durch ein Schaufelrad in Bewegung gehalten.

3 Ergebnisse

3.1 Allgemeines zu den *Pavlova*-Arten

Pavlova lutheri (SAG 926-1) ist eine der bisher am häufigsten untersuchten *Pavlova*-Arten. Diese Art weist in Kultur eine bräunlich-gelbe Färbung auf, die Zellen haben eine Größe von 4,8 bis 7,2 µm (gemessen).

Pavlova viridis wurde erst relativ spät von CHEN, J. isoliert und beschrieben (CHEN, J; HE, Y; TAN, G.; LIU, X.; PAN, Y., GAO, Y.; LI, S., 1985: Two newly isolated marine Chrysophyta and its food values to *Mytilus edulis* larva. Trans. Oceanol. Limnol., 1985 (2): 44 – 46) Die Kultur dieser Art hat eine grüne Farbe, die Zellen weisen eine Größe von ca. 5 µm auf (gemessen).

Pavlova sp. (CCMP 1228) weist in Kultur eine ähnlich grüne Färbung auf wie *P. viridis*. Die Zellgröße liegt zwischen 5 und 7 µm (gemessen).

Pavlova sp. (CCMP 459) weist in der Kultivierung eine bräunliche Farbe auf, die Zellgröße wurde auf 4,8 bis 5,3 µm bestimmt. Schon während der routinemäßigen Verdünnungen der back-up-Kultur zeigte sich, dass diese Art schwierig zu kultivieren ist – trotz unveränderter und optimaler Bedingungen (Temperatur, Licht, Nährstoffe) starb diese Kultur mehrmals ab.

P. pinguis (CCMP 609) zeigt in Kultur ebenfalls eine bräunliche Färbung, die Zellgröße liegt zwischen 4,8 und 6 µm (gemessen).

3.2 2-Liter Photobioreaktoren

3.2.1 Experimente zur Ermittlung der Temperaturtoleranzen der verschiedenen *Pavlova*-Arten

3.2.1.1 P. lutheri (SAG-926-1)

Für den ersten Versuch wurde *Pavlova lutheri* (SAG 926-1) gewählt, da sie eine der bisher am häufigsten untersuchten *Pavlova*-Arten ist.

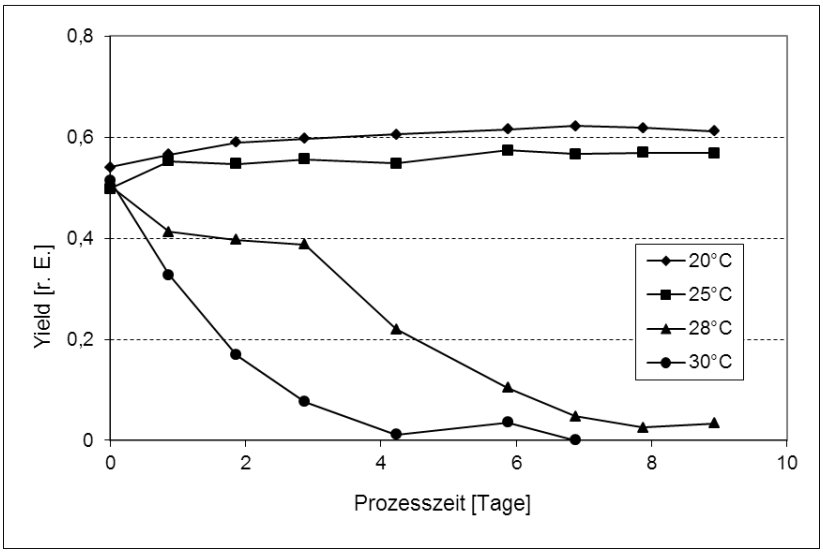

Abb. 4 Yield von *P. lutheri* (SAG-926-1) in Abhängigkeit von der Temperatur

Aus Abb. 4 und Abb. 5 wird deutlich, dass *P. lutheri* nur bei Temperaturen bis max. 25°C kultiviert werden kann. In Abb. 4 Yield von *P. lutheri* (SAG-926-1) in Abhängigkeit von der Temperaturist der Yield in Abhängigkeit von Temperatur und Versuchsdauer dargestellt. Es wird deutlich, dass in den Reaktoren mit 28 und 30°C der Yield der Kultur schon kurz nach Versuchsbeginn zu sinken beginnt, was auf einen schlechten physiologischen Zustand der Zellen schließen lässt. Dieses Ergebnis spiegelt auch die Darstellung der Optischen Dichte der Kulturen wider (vgl. Abb. 5): in den Ansätzen mit 25 und 28°C ist keine nennenswerte Steigerung bzw. sogar ein Absinken der OD zu verzeichnen. Hier starb diese *Pavlova*-Art ab.

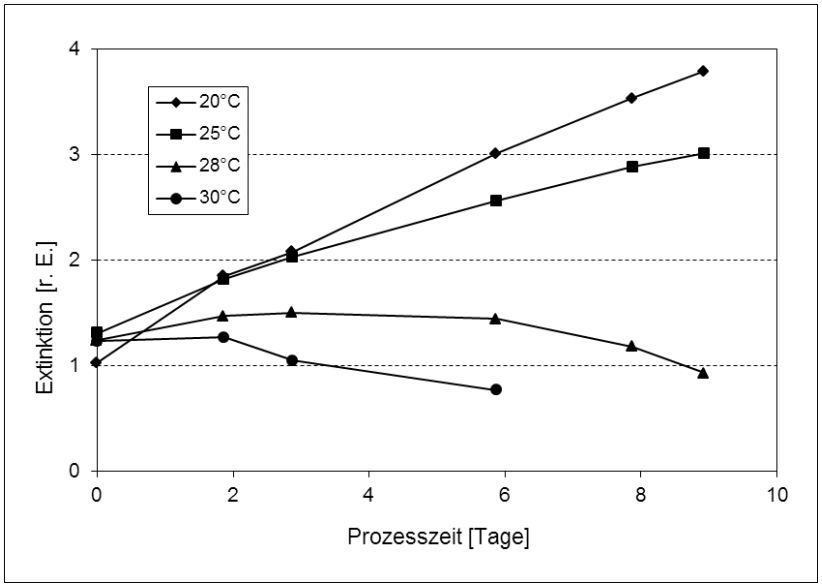

Abb. 5 Optische Dichte von *P. lutheri* (SAG 926-1) in Abhängigkeit von der Temperatur

Mit diesen Ansprüchen an die Kultivierungsbedingungen scheidet P. lutheri für die Kultivierung unter Gewächshausbedingungen aus, da dort im Sommer die Temperaturen oftmals 25°C übersteigen. An *P. lutheri* wurden daher keine weiterführenden Untersuchungen durchgeführt.

3.2.1.2 *Pavlova viridis*

Die nächsten Temperaturversuche wurden an *P. viridis* durchgeführt. Aus den Messwerten der Optischen Dichte (Abb**.** 6) wird deutlich, dass diese *Pavlova*-Art zunächst bei allen gegebenen Versuchstemperaturen gut wächst bzw. Biomasse aufbaut. Ab dem sechsten Versuchstag nimmt der Ansatz mit 30°C kaum noch an Biomasse zu; allerdings kann dies auch auf die kurz zuvor stattgefundene Temperaturerhöhung auf 35°C zurückzuführen sein. Daher wurde dieser Ansatz neu gestartet (zu dem Zeitpunkt, an dem auch die anderen Ansätze verdünnt wurden). Nach der Verdünnung sind deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Ansätzen zu verzeichnen: der Ansatz mit 20°C erreicht die höchsten OD-Werte, gefolgt vom 25°C-Ansatz. Hier ist der Unterschied durch die unterschiedlichen Start-Ods der beiden Ansätze bedingt; die Zunahme ist in beiden Ansätzen gleich. Der 28°C–Ansatz bleibt mit der OD unter denen des 25°C-Ansatzes. Die geringste OD-Zunahme erzielt der Ansatz mit 30°C.

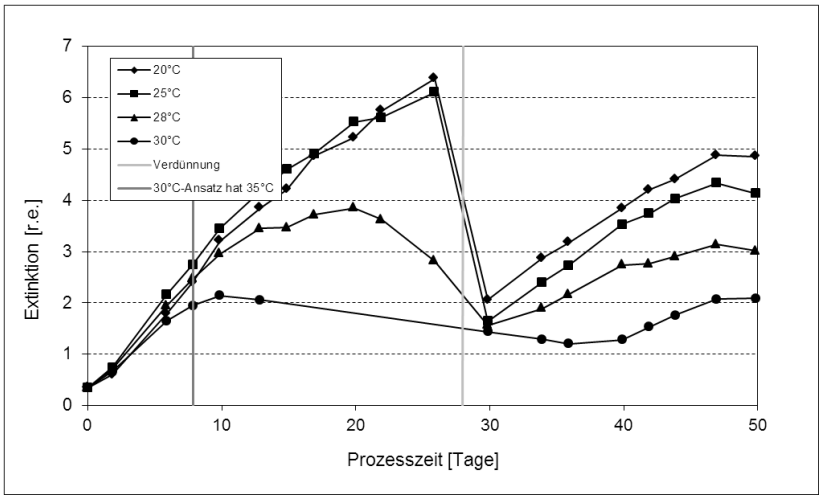

Abb. 6 Optische Dichte von *P. viridis* in Abhängigkeit von der Temperatur

Die Fettsäureanalyse dieses Versuches konnte aufgrund technischer Probleme nicht vollständig durchgeführt werden. Im 28°C Ansatz zeigt sich aber eine deutliche Steigerung des EPA-Gehaltes über einen Zeitraum von ca. 18 Tagen. Beim 25°C-Ansatz ist im ersten Versuchsteil eine Steigerung an dieser Fettsäure zu erkennen, nach der Verdünnung allerdings eine Abnahme.

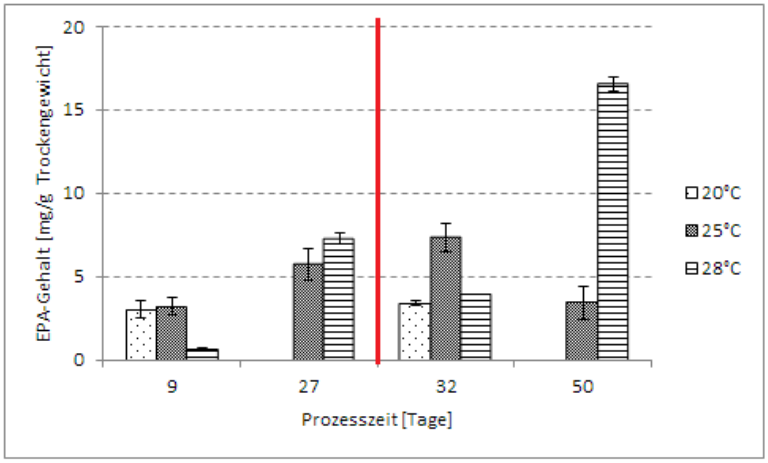

Abb. 7 EPA-Gehalt von *P. viridis* in Abhängigkeit von Temperatur (und Alter der Kultur), roter senkrechter Strich = Verdünnung

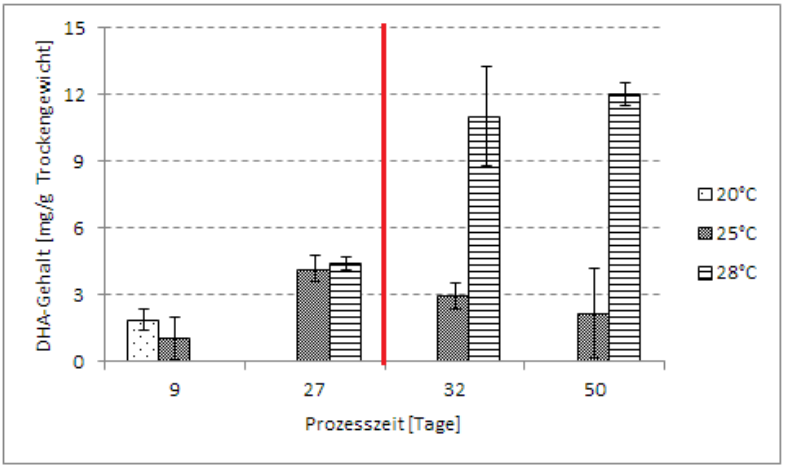

Abb. 8 DHA-Gehalt von *P. viridis* in Abhängigkeit von Temperatur und Alter der Kultur

Aus den Ergebnissen der DHA-Analyse ergibt sich eine geringe Zunahme dieser Fettsäure im 28°C-Ansatz (zwischen Tag 32 und Tag 50), beim 25°C-Ansatz sind keine signifikanten Änderungen zu verzeichnen. Für die anderen Ansätze liegen keine oder nur ein Ergebnis vor (vgl. Abb. 8).

3.2.1.3 *P. viridis* (Wiederholungsversuch)

Um die Ergebnisse des vorigen Versuches zu verifizieren, wurde *P. viridis* erneut bei unterschiedlichen Temperaturen (20, 24, 28 und 32°C) kultiviert. Der Versuchsaufbau war dabei mit dem des vorigen Versuches identisch.

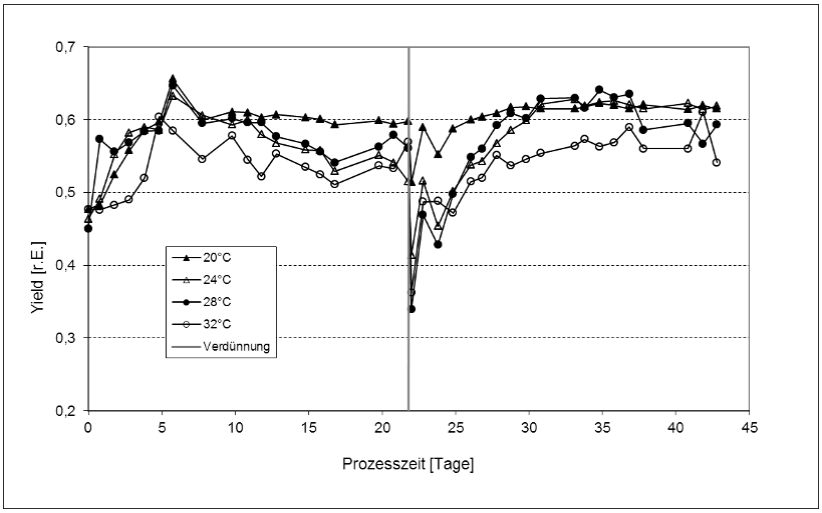

Abb. 9 Yield von *P. viridis* bei unterschiedlichen Kultivierungstemperaturen

Im Verlauf des Versuches wird deutlich, dass die photosynthetische Aktivität des Ansatzes mit der höchsten Temperatur unter denen der anderen Versuchsansätze bleibt (vgl. Abb. 9). Die höchsten Yield-Werte weist der Ansatz mit 20°C Kultivierungstemperatur auf.

Aus den Messungen der Optischen Dichte (Abb. 10) wird deutlich, dass der Ansatz mit der höchsten Temperatur gegenüber den anderen im Wachstum gehemmt ist: der Ansatz mit 32°C weist vor der Verdünnung deutlich geringere Messwerte auf als die übrigen Ansätze. Und auch nach der Verdünnung bleibt dieser Ansatz hinter den anderen zurück. Zwischen den übrigen Ansätzen sind keine signifikanten Unterschiede in der OD erkennbar (Unterschiede nach der Verdünnung beruhen auf unterschiedlichen Start-Ods). Auffällig ist aber, dass diese Ansätze nach der Verdünnung nicht mehr die maximalen OD-Werte wie vor der Verdünnung erzielen.

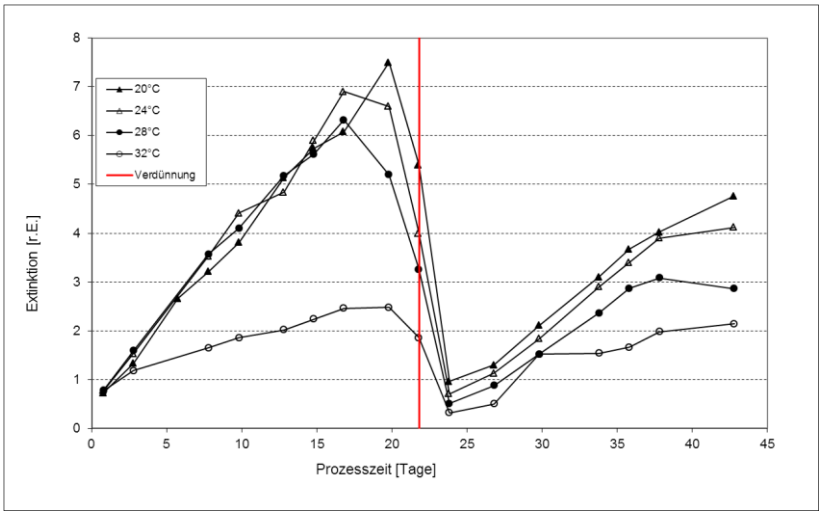

Abb. 10 Optische Dichte von *P. viridis* bei unterschiedlichen Kultivierungstemperaturen

Die Trockenmassebestimmung liefert Hinweise auf geringe Unterschiede zwischen den Ansätzen: der 20°C-Ansatz erreicht die höchsten BTM-Werte, gefolgt dem 24°C und 28°C-Ansatz. Der 32°C-Ansatz bleibt in der Trockenmasse deutlich hinter den anderen Ansätze zurück und erreicht maximal 1/3 der BTM des 20°C-Ansatzes (vgl. Abb. 11).

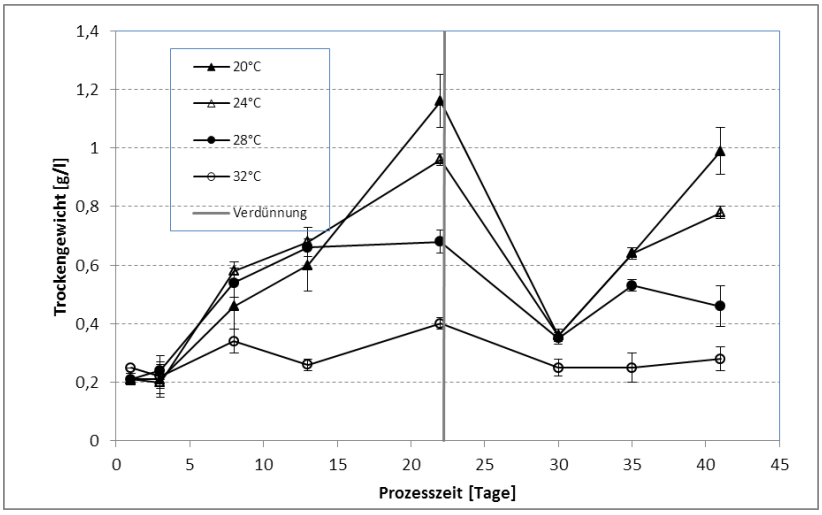

Abb. 11 Bruttotrockenmasse von *P. viridis* bei unterschiedlichen Kultivierungstemperaturen

Der EPA-Gehalt lässt keinen signifikanten Unterschied zwischen den unterschiedlichen Versuchstemperaturen erkennen. In den Ansätzen mit 20°C bzw. 24°C steigt der EPA-Gehalt vom achten zum 13. Versuchstag leicht an. Am 22. Versuchstag ist der Gehalt an EPA in diesen beiden Ansätzen bereits wieder etwas zurückgegangen. Vom 28°C-Ansatz liegen nur Daten vom achten und 22. Versuchstag vor, wobei hier keine Änderungen im EPA-Gehalt zu erkennen sind. Vom 32°C-Ansatz liegen lediglich Daten vom 13. Und 22. Versuchstag vor, hier ist eine leichte Abnahme von EPA zu verzeichnen (vgl. Abb. 12).

Insgesamt betrachtet wurden die höchsten EPA-Gehalte in den Ansätzen mit 20 und 24°C erreicht.

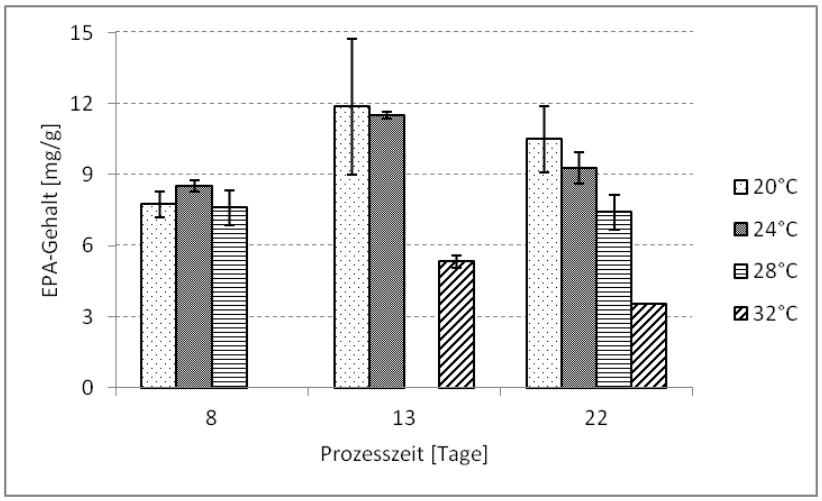

Abb. 12 EPA-Gehalt von *P. viridis* in Abhängigkeit von der Temperatur (vor der Verdünnung)

Auch die DHA-Gehalte der Versuchsansätze lassen keine eindeutigen Rückschlüsse auf den Einfluss der Temperatur auf diese Fettsäure zu: lediglich am achten Versuchstag war der DHA-Gehalt im Ansatz mit 28°C deutlich gegenüber den anderen stark erhöht, und am 22. Versuchstag ist der DHA-Gehalt im 32°C-Ansatz deutlich niedriger als in den anderen Kulturen (vgl. Abb. 13). Die höchsten DHA-Gehalte vom 20°C- und 24°C-Ansatz sind auch hier am 13. Versuchstag zu verzeichnen, was mit den Ergebnissen der EPA-Analyse korreliert.

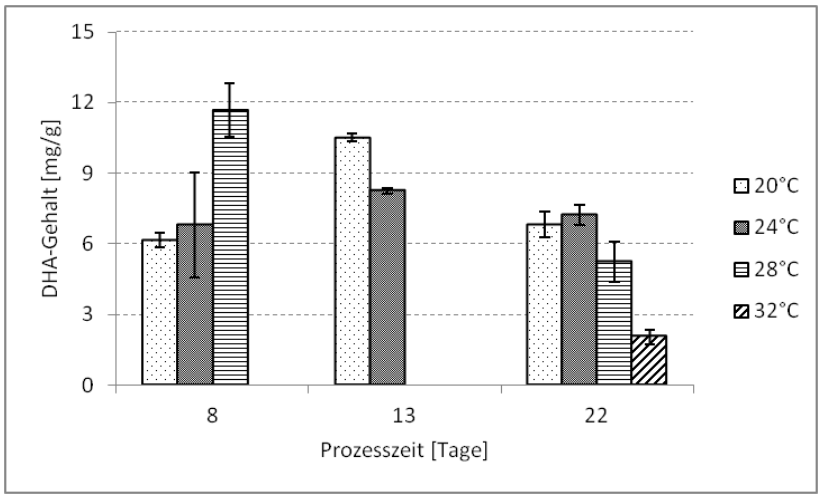

Abb. 13 DHA-Gehalt von *P. viridis* in Abhängigkeit von der Temperatur (vor der Verdünnung)

3.2.1.4 *Pavlova sp.* – CCMP 1228

Die in Abb. 14 dargestellten Messwerte des Yields der einzelnen Versuchsansätze von CCMP 1228 zeigen, dass die gegebenen Temperaturen kaum nennenswerten Einfluss auf die Effizienz der Photosynthese dieser *Pavlova*-Art haben. Ab dem elften Versuchstag ist allerdings ein Absinken des Yields im 30°C-Ansatz zu verzeichnen. Auch eine 10%-ige Mediumzugabe am 13. Versuchstag führt zu keinem erneuten Anstieg des Yields dieses Ansatzes. Ab dem 18. Versuchstag ist in allen Ansätzen ein Absinken des Yields zu verzeichnen. Dieses ist auf das zunehmende Alter der Kulturen im Versuch zurückzuführen. Da es sich bei den Versuchen um batch-Versuche handelt, nimmt das Alter der Kultur ständig zu und damit treten vermehrt absterbende Zellen in der Kultur auf. Deren niedriger Yield geht ebenso wie der hohe Yield der intakten Zellen in den Messwert mit ein, so dass der Gesamtwert sinkt.

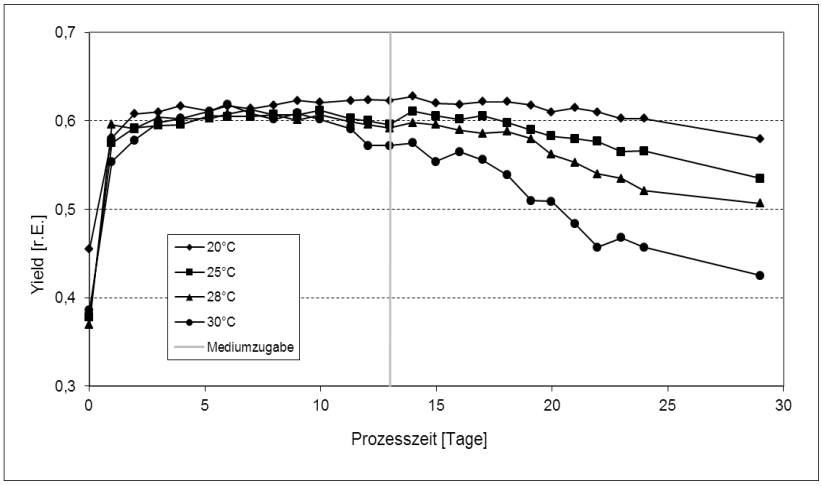

Abb. 14 Yield von *P. sp.* in Anhängigkeit von Temperatur und Prozesszeit

Der Verlauf der Optischen Dichte über den Versuchszeitraum (vgl. Abb. 15) zeigt bis zum zehnten Versuchstag keine nennenswerten Unterschiede zwischen den verschiedenen Ansätzen. Danach

nimmt die Optische Dichte im 30°C- Ansatz langsamer zu als in den anderen drei Ansätzen. Ab dem 22. Versuchstag beginnt die Optische Dichte in diesem Ansatz zu sinken.

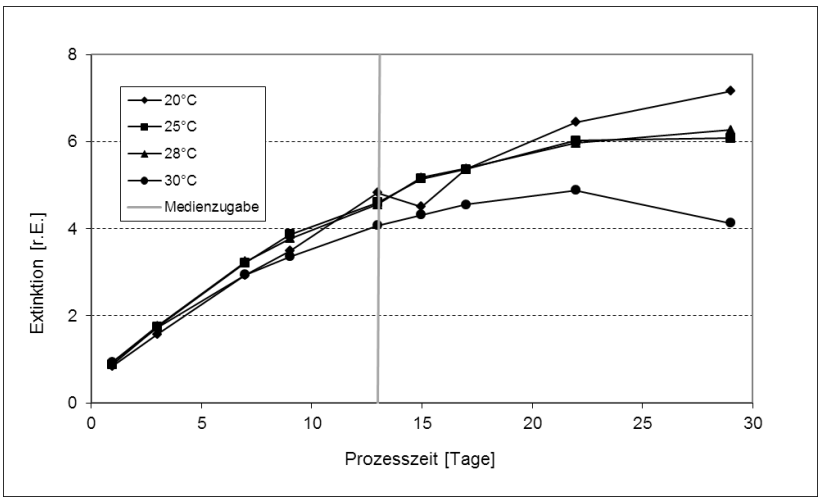

Abb. 15 Ergebnisse der Messungen der Optischen Dichte an CCMP 1228

Die gaschromatographische Analyse der Fettsäuren dieses Versuches liefern eine Tendenz bezüglich der EPA und DHA-Werte von CCMP 1228 bei unterschiedlichen Kultivierungstemperaturen: einen Tag nach der erneuten Medium-Zugabe sind die EPA-Gehalte der vier Ansätze nahezu gleich hoch. In allen Versuchsansätzen nimmt der EPA-Gehalt (pro Gramm Trockengewicht) vom achten bis zum 14-ten Versuchstag zu. Am 23-ten Tag sind die EPA- Gehalte im Ansatz mit 25°C und 20°C am höchsten, während die Gehalte dieser Fettsäure in den anderen beiden Ansätzen deutlich niedriger sind (vgl. Abb. 16). Damit scheinen gemäßigtere Temperaturen (20 bis 25°C) die Synthese von EPA bei CCMP 1228 positiv zu beeinflussen.

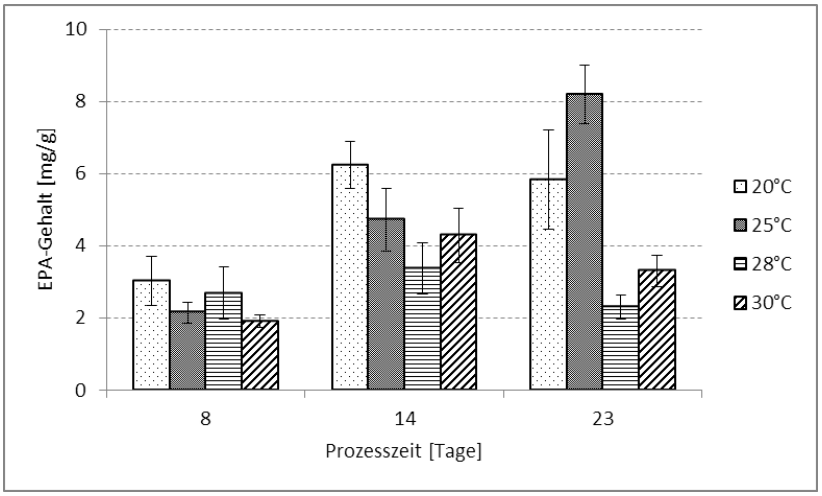

Abb. 16 EPA-Gehalt [mg/g Trockengewicht] von CCMP 1228 bei unterschiedlichen Kultivierungstemperaturen

Aus den Ergebnissen der DHA-Bestimmung (Abb. 17) lassen sich keine eindeutigen Schlüsse ziehen: lediglich im 25°C-Ansatz ist eine deutliche Zunahme dieser Fettsäure von 3 mg/g auf 7mg/g Trockengewicht zu verzeichnen. Bei den anderen Ansätzen ist keine eindeutige Veränderung zu erkennen – die DHA-Gehalte bleiben nahezu gleich hoch oder sinken.

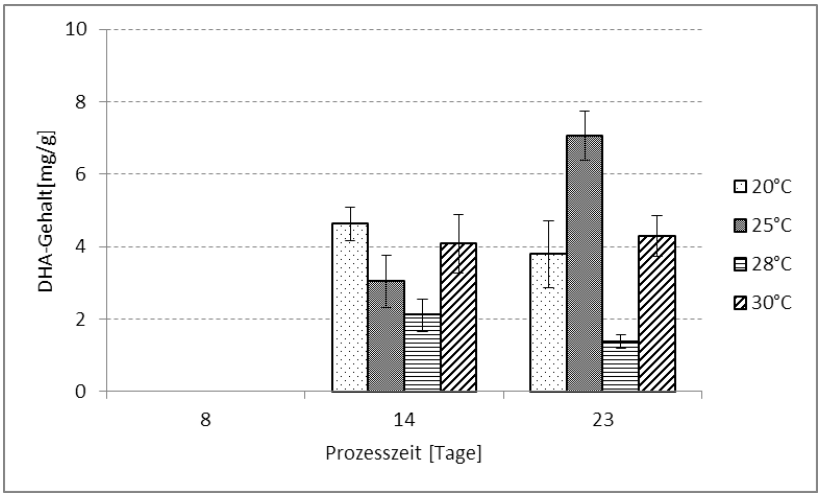

Abb. 17 DHA-Gehalt [mg/g Trockengewicht] von CCMP 1228 bei unterschiedlichen Kultivierungstemperaturen; die Werte für den achten Versuchstag wurden nicht detektiert

3.2.1.5 *Pavlova sp.* – CCMP 459

Wie eingangs erwähnt, zeigte diese Art schon während der routinemäßigen Verdünnungen der back-up-Kultur, dass sie schwierig zu kultivieren ist.

Aus Abb. 18 wird deutlich, dass CCMP 459 bei Temperaturen über 28°C nicht kultivierbar ist, der Yield des Ansatzes mit 30°C fiel bereits am zweiten Versuchstag auf Null.

Der Yield des Ansatzes mit 28°C fiel ab dem fünften Versuchstag stetig ab, was die geringe Temperaturtoleranz dieser Art unterstreicht.

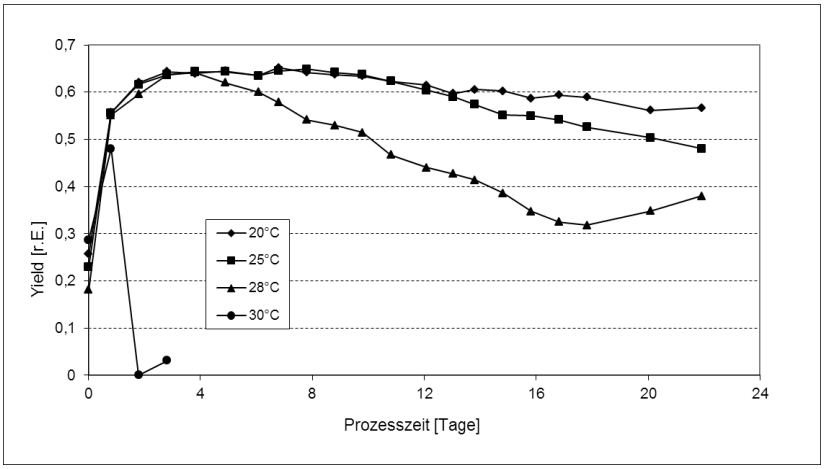

Abb. 18 Yield von 459 in Abhängigkeit von Temperatur und Prozesszeit

In Abb. 19 ist die Optische Dichte von CCMP 459 über den zeitlichen Verlauf des Versuches dargestellt. Da der 30°C-Ansatz am zweiten Versuchstag abgestorben war, endet die Kurve dieses Ansatzes an diesem Tag. Bis zum 15. Versuchstag ist in allen anderen Ansätzen ein Zuwachs der OD zu verzeichnen. Danach sinkt die OD des 28°C-Ansatzes bis zum Versuchsende ab. Der 25°C-Ansatz erreicht seine maximale OD am 18. Versuchstag.

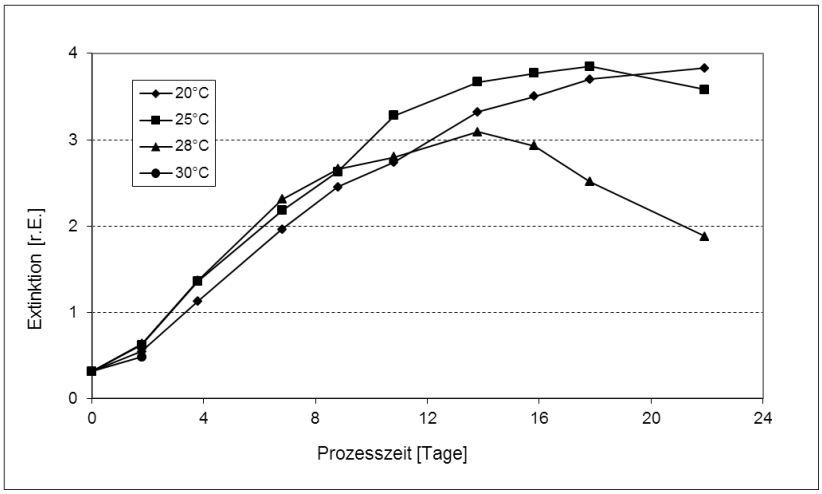

Abb. 19 Optische Dichte von 459 in Abhängigkeit von Temperatur und Prozesszeit

Die BTM (Abb. 20) nimmt in allen drei verbleibenden Ansätzen bis zum zehnten Versuchstag zu, was sich mit den Ergebnissen der Optischen Dichte deckt.

Das anschließende Abfallen der BTM-Kurven (trotz steigender OD) kann mit der Darstellung des Yields (Abb. 18) erklärt werden: in allen Ansätzen sinkt der Yield ab dem zehnten Versuchstag, was auf eine abnehmende Zahl photosynthetisch aktiver Zellen (sprich: lebender Zellen) hinweist.

Da nur geringe Trockenmassen erzielt wurden (vgl. Abb. 20) und diese Art nur schlecht zu kultivieren ist, wurde auf weiterführende Untersuchungen verzichtet.

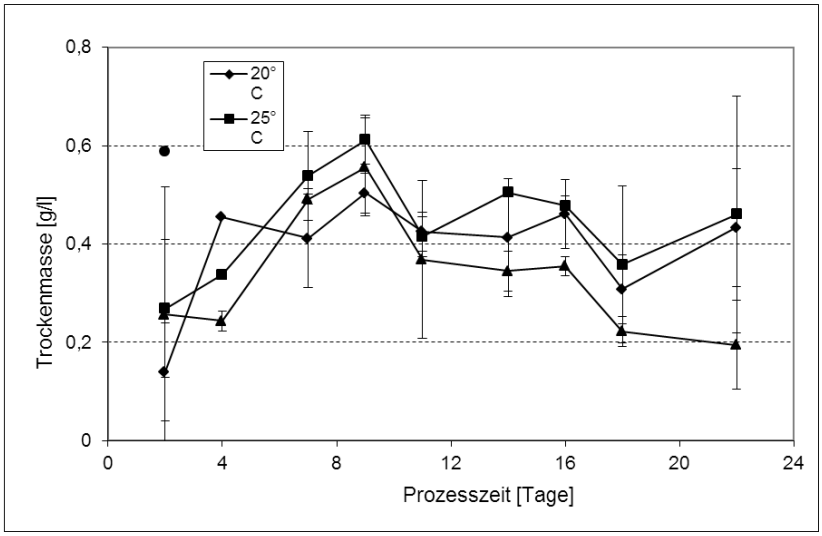

Abb. 20 Bruttotrockenmasse von CCMP 459 in Abhängigkeit von Temperatur und Prozesszeit

Durch gaschromatographische Untersuchungen konnte auch für diese Art nachgewiesen, dass sie sowohl EPA als auch DHA enthält. In Abb. 21 sind die Chromatogramme von *Nannochloropsis sp.*, *Isochrysis sp.* und *Pavlova sp.* (CCMP 459) übereinander gelagert dargestellt.

Es wird deutlich, dass *Nannochloropsis* kein DHA enthält, während *Isochrysis sp.* und *Pavlova sp.* über EPA und DHA verfügen. An der Höhe der Peaks ist gut ersichtlich ist, dass *Isochrysis* zwar mehr DHA enthält als *Pavlova sp.*, dieses Verhältnis für EPA aber umgedreht ist.

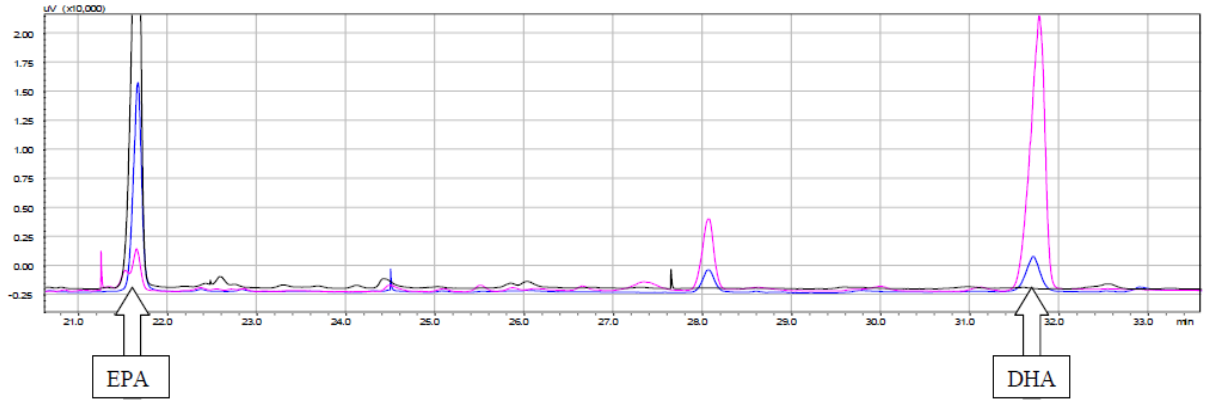

Abb. 21 Gaschromatogram von CCMP 459 (---- = *Nannochloropsis sp.*, ---- = Isochrysis *sp.*, ---- CCMP 459)

Für den Versuch liegen keine Daten für den DHA-Gehalt bei den unterschiedlichen Temperaturen vor. Die Ergebnisse der EPA-Analyse sind in Abb**.** 22 dargestellt, auch hier fehlen aufgrund eines Gerätedefektes einige Daten. Die höchsten EPA-Gehalte werden am 22. Versuchstag in dem Ansatz mit 20°C erzielt.

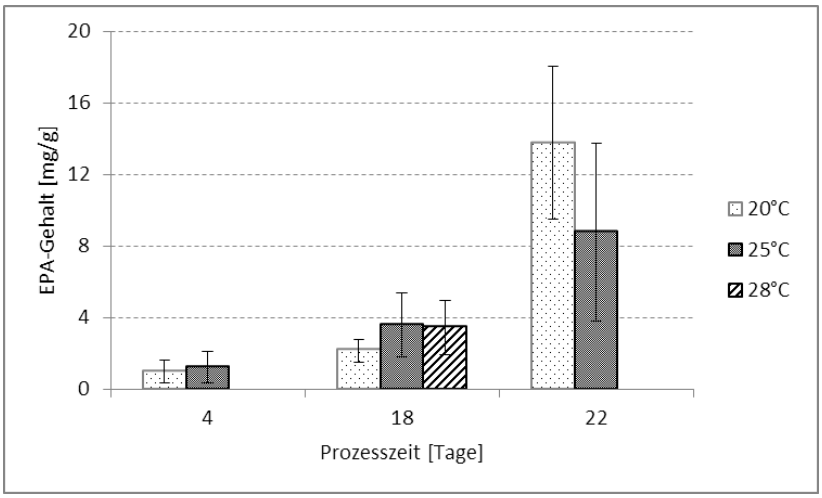

Abb. 22 EPA-Gehalt von CCMP 459 in Abhängigkeit von Temperatur und Versuchsdauer

3.2.1.6 *P. pinguis* – CCMP 609

Als letzte Art wurde *P. pinguis* (CCMP 609) auf ihre Temperaturtoleranz hin getestet. Bei Betrachtung

von und Abb. 24 ist festzustellen, dass diese *Pavlova*-Art bei 20°C am schlechtesten wächst: der Yield fängt früher an zu sinken, die Optische Dichte bleibt hinter denen der anderen Ansätze zurück.

Der Yield des Ansatzes mit 30°C sinkt ähnlich schnell wie der des 20°C-Ansatzes. Dafür erreicht der 30°C-Ansatz eine höhere Optische Dichte (vgl. Abb. 24).

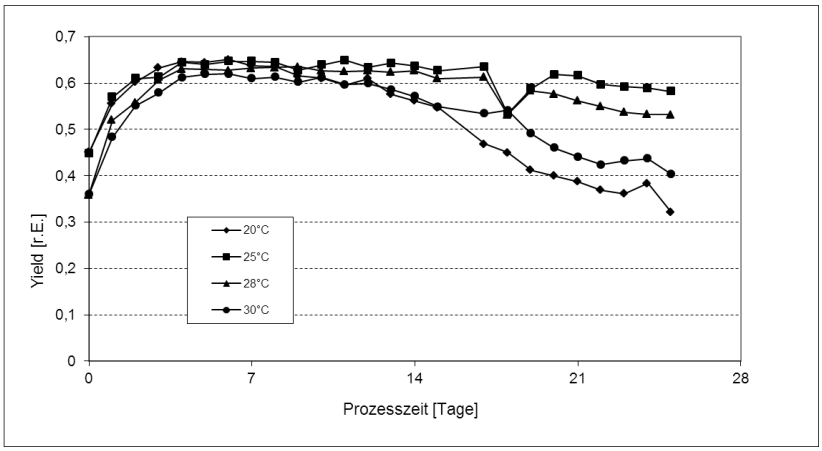

Abb. 23 Yield von *P. pinguis* in Abhängigkeit von Temperatur und Prozesszeit

Aus der Darstellung der Optischen Dichte über den zeitlichen Verlauf des Versuches (Abb. 24) ist ersichtlich, dass bis zum achten Versuchstag die OD in allen Ansätzen gleich stark zunimmt. Danach ist die Zunahme der OD im 20°C-Ansatz gegenüber den anderen Ansätzen verringert. Am 15. Versuchstag beginnt auch im 28°C-Ansatz die Od zu sinken.

Am 21. Versuchstag haben die Ansätze mit 20°C und 25°C ihr Maximum erreicht.

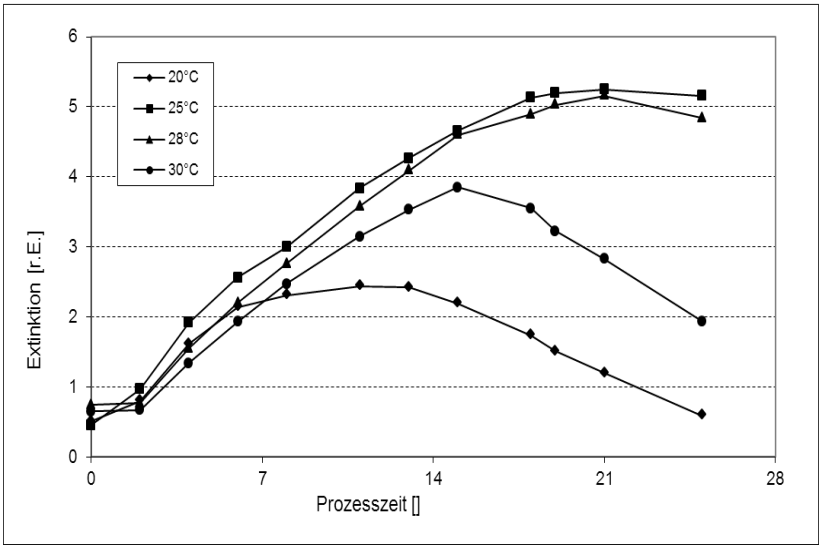

Abb. 24 Optische Dichte von *P. pinguis* in Abhängigkeit von Temperatur und Prozesszeit

Die Bestimmung der Zellzahl (vgl. Abb. 25) unterstützt die Ergebnisse der Auswertungen des Yields bzw. der OD: der 20°C-Ansatz weist eine geringere Zellzahl als die übrigen Ansätze auf.

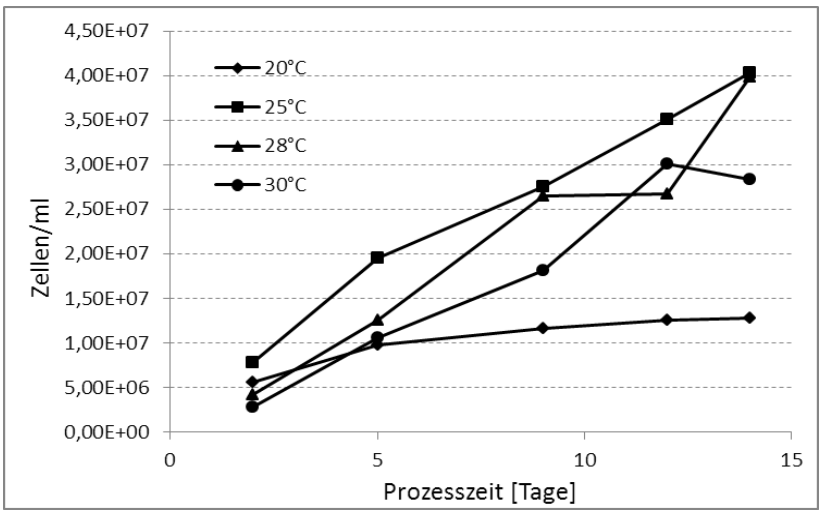

Abb. 25 Zellzahl von *P. pinguis* in Abhängigkeit von Temperatur und Prozesszeit

3.2.2 Zusammenfassung der Temperaturversuche

In Tabelle 1 werden die maximal erreichten Optischen Dichten (ein Maß für das Wachstum der Algen und die erzielbare Biomasse) der verschiedenen *Pavlova*-Arten bei den unterschiedlichen, getesteten Temperaturen verglichen.

Tabelle 1 Übersicht der maximal erzielten Optischen Dichten der unterschiedlichen *Pavlova*-Arten in den 2-Liter-Photobiotreaktoren bei unterschiedlichen Temperaturen

	20°C	**25°C**	**28°C**	**30°C**
***P. lutheri* (SAG 926-1)**	3,8	3,0	1,5	1,3
P. viridis	6,4	6,1	3,9	2,1
CCMP 1228	7,1	6,1	6,3	4,8
CCMP 459	3,8	3,9	3,1	---
CCMP 609	2,9	5,2	5,1	3,8

Es wird deutlich, dass die höchsten Dichten bei *Pavlova sp.* (CCMP 1228) erzielt wurden. Diese Art zeigt auch die höchste Temperaturtoleranz von den fünf getesteten Arten.

Auch die in Abb. 26 dargestellten Bruttotrockenmassen (BTM) unterstreichen die Aussage der Optischen Dichte. *CCMP 1228* erreicht bei allen gegebenen Temperaturen höhere Trockengewichte als P. *viridis*.

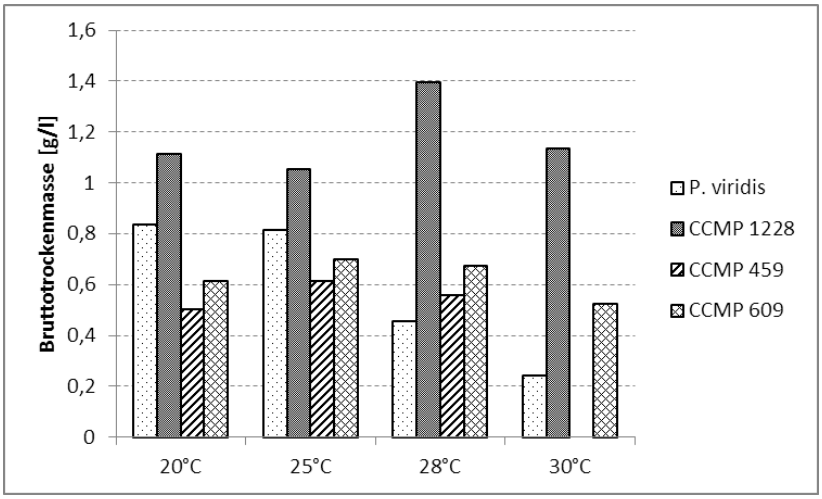

Abb. 26 maximal erreichte Trockenmassen (BTM) der getesteten *Pavlova*-Arten bei unterschiedlichen Temperaturen

Tabelle 2 Übersicht über die in den Temperaturversuchen erzielten max. Werte von EPA und DHA (in der stationären Phase der Kultur ermittelt) Die Temperaturwerte sind in Klammern angegeben

	P. viridis	CCMP 1228	CCMP 609	CCMP 459	*P. lutheri*
max. EPA-Gehalt [mg/g Trockengew.]	16,6 (28°C)	13,1 (28°C)	19,8 (20°C)	13,7 (20°C)	13,9 (20°C)
max. DHA-Gehalt [mg/g Trockengew.]	12,1 (28°C)	10,8 (28°C)	---	5,77 (20°C)	8,9 (20°C)

Es wird deutlich, dass *P. viridis* und CCMP 1228 die höchsten EPA- und DHA- Gehalte bei einer Temperatur von 28°C erreichen, dabei erzielte *P. viridis* noch ein wenig höhere Werte dieser Fettsäuren. Alle anderen getesteten Arten erreichen ihre EPA- und DHA- Maxima bei einer Kultivierungstemperatur von 20°C.

3.2.3 Untersuchungen zur Fettsäuresynthese unter gleichen Temperaturbedingungen

In den 2-Liter-Photobioreaktoren wurden die vier *Pavlova*-Arten *P. viridis*, CCMP 609, CCMP 1228 und *P. lutheri* unter gleichen Licht- und pH-Bedingungen kultiviert. Die Temperatur betrug bei allen Ansätzen ca. 20°C. Es zeigte sich deutlich, dass *P. lutheri* bei diesen Bedingungen die höchsten EPA-Gehalte acht Tage nach der Verdünnung erzielte, während CCMP 1228 bei diesem Versuch nur niedrige Gehalte an dieser Fettsäuren erreichte, wobei deren Gehalt stetig über die Versuchsdauer zunahm. (vgl. Abb. 27 und Abb. 28).

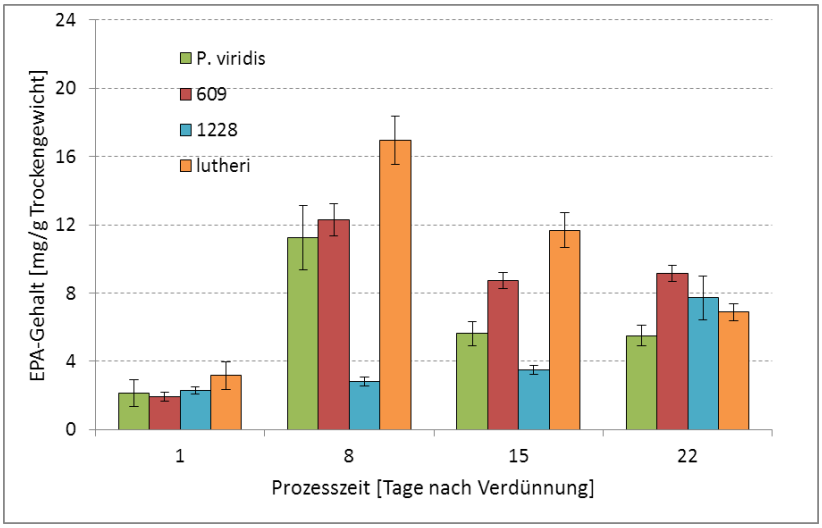

Abb. 27 EPA-Gehalte der verschiedenen *Pavlova*-Arten bei fester pH- und Temperatureinstellung

Auch P. viridis und CCMP 609 erreichten in diesem Versuch den höchsten EPA-Gehalt am achten Versuchstag (11 bzw. 12,5 mg/g Trockengewicht), danach sank der Gehalt auf ca. 7 bzw. 9 mg/g.

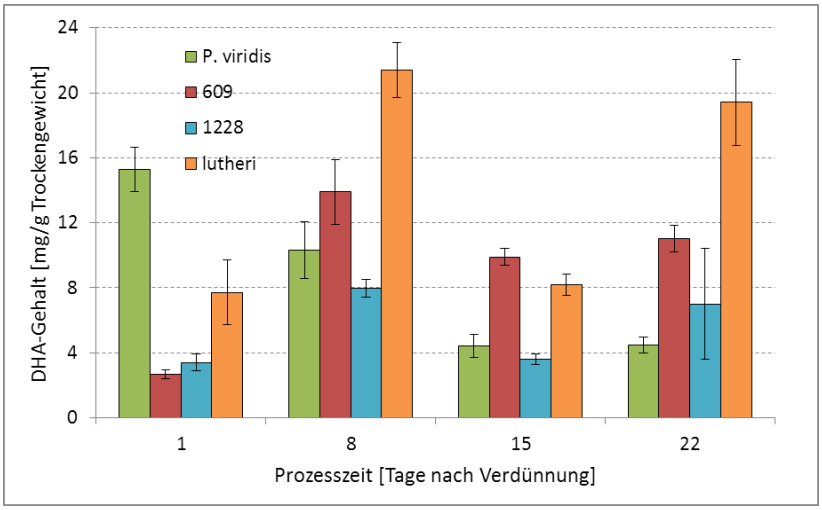

Abb. 28 DHA-Gehalte der verschiedenen *Pavlova*-Arten bei fester pH- und Temperatureinstellung

Die Ergebnisse der DHA-Bestimmung dieses Versuches zeigt, dass der Gehalt dieser Fettsäure bei P. viridis kontinuierlich über die Versuchsdauer abnimmt. Für die anderen drei Arten werden auch hier die höchsten Fettsäuregehalte am achten Versuchstag erreicht. Auffällig ist die große Schwankung der DHA-Werte von P. lutheri: am achten Versuchstag wurde ein DHA-Gehalt von ca. 22 mg/g Trockengewicht ermittelt, am 15. Tag ein Wert von 8 mg/g, der dann bis zum 22. Tag wieder auf fast 20 mg/g gestiegen war.

Auch wenn P. lutheri in diesem Experiment die höchsten EPA- und DHA-Gehalte erreichte, kommt sie wegen ihrer Temperaturempfindlichkeit (vgl. die ersten Temperaturversuche) nicht für die Kultivierung im Gewächshaus in Frage. Selbiges gilt für CCMP 609. Außerdem erreichen P. lutheri und CCMP 609 nur deutlich geringere Biomassen als CCMP 1228 bzw. P. viridis (vgl. Abb. 29).

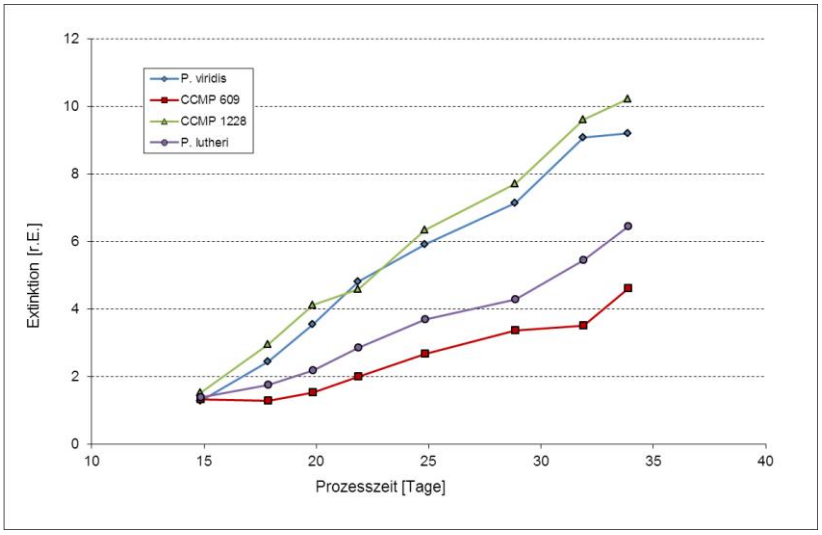

Abb. 29 Optische Dichte der *Pavlova*-Arten bei fester pH- und Temperatureinstellung

3.2.4 Experimente zu den Nährstoffbedürfnissen ausgewählter *Pavlova*-Arten

Nachdem alle fünf *Pavlova*-Arten auf ihre Temperaturtoleranz hin untersucht worden sind, wurden die zwei vielversprechendsten Arten weiterführend untersucht.

P. viridis und *Pavlova* sp. (CCMP 1228) hatten sich als temperaturtolerant und gut kultivierungsfähig erwiesen, so dass diese beiden Arten in einem Versuch mit modifiziertem Medium eingesetzt wurden.

Da Vitamine bei der Medienzubereitung eine Schwachstelle bezüglich der Sterilität des Mediums bedeuten (Vitamine können nicht autoklaviert oder ozonisiert werden und müssen daher über einen Sterilfilter zugegeben werden) und zudem einen wichtigen Kostenfaktor ausmachen, wurde getestet, ob *Pavlova* auch ohne Vitamine bzw. ohne bestimmte Vitamine zu kultivieren ist.

In der Literatur finden sich zudem Hinweise darauf, dass zumindest nicht alle im „normalen“ f-Medium enthaltenen Vitamine für ein optimales Wachstum von *Pavlova* notwendig sind (CARVALHO, A.*P.* PONTES; I., GASPAR, H., MALCATA, F.X., Enzyme and Microbial Technology 38, (2006), 358 - 366).

3.2.4.1 Einfluss der Vitaminverfügbarkeit auf CCMP 1228 und P. *viridis*

Für diesen Versuch wurden je *Pavlova*-Art zwei 500ml-Schottflaschen (mit Begasung) angesetzt, eine als Kontrollansatz (Vollmedium 2f) und eine als Versuchsansatz (2f-Medium ohne Vitamine).

In den ersten Versuchstagen zeigte sich kein deutlicher Unterschied bzgl. des Yields zwischen den Ansätzen mit bzw. ohne Vitamine (vgl. Abb. 30). Das lag vermutlich daran, dass durch das Inokulum ausreichend Vitamine in den Versuchsansatz gelangt waren. Daher wurden die Ansätze nochmals mit dem jeweiligen Medium verdünnt.

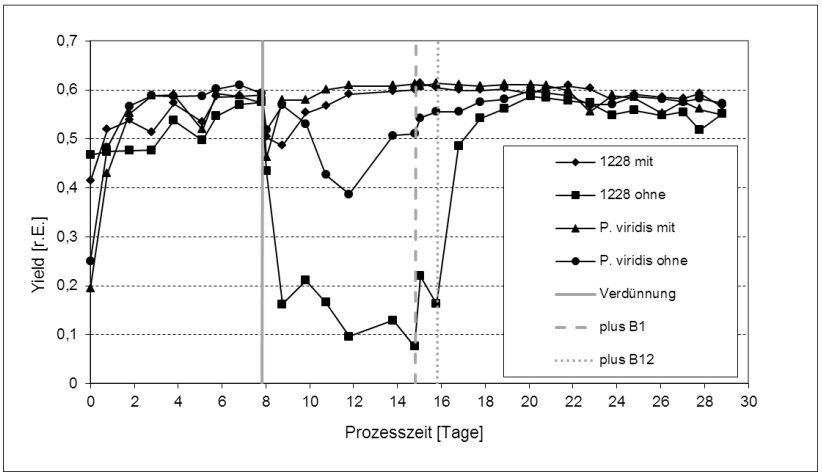

Abb. 30 Yield von CCMP 1228 und *P. viridis* in Abhängigkeit von Vitaminen im Medium

Nach der Verdünnung ist sowohl im Yield (Abb. 30) als auch in der Optischen Dichte (Abb. 31) deutlich zu erkennen, dass CCMP 1228 ohne Vitamine nicht wachsen kann.

Auch der Yield von *P. viridis* ging nach der Verdünnung zunächst zurück, erholte sich aber und war nach zehn Tagen wieder annähernd auf dem Niveau wie vor der Verdünnung.

Dem vitaminlosen Ansatz von CCMP 1228 wurde, nachdem der Yield unverändert niedrig blieb, zunächst eine definierte Menge Vitamin B_1 zugegeben. Der Yield stieg nach dieser Gabe stark an, fiel am darauffolgenden Tag aber wieder. Nun erfolgte die Zugabe einer ebenfalls definierten Menge an Vitamin B_{12}. Es wird davon ausgegangen, dass B_1 lediglich als „Katalysator" für die B_{12} –Aufnahme fungiert, und B_{12} essentiell für *Pavlova* ist (CARVALHO, A.*P.* PONTES; I., GASPAR, H., MALCATA, F.X., Enzyme and Microbial Technology 38, (2006), 358 - 366). Tatsächlich erholte sich der Yield von CCMP 1228 nach der Zugabe von B_{12} vollständig (Abb. 30).

Die Messungen der Optischen Dichte dieses Versuches zeigen deutlich, dass sich das Fehlen von Vitaminen im Medium negativ auf das Wachstum von CCMP 1228 und *P. viridis* auswirkt (vgl. Abb. 31).

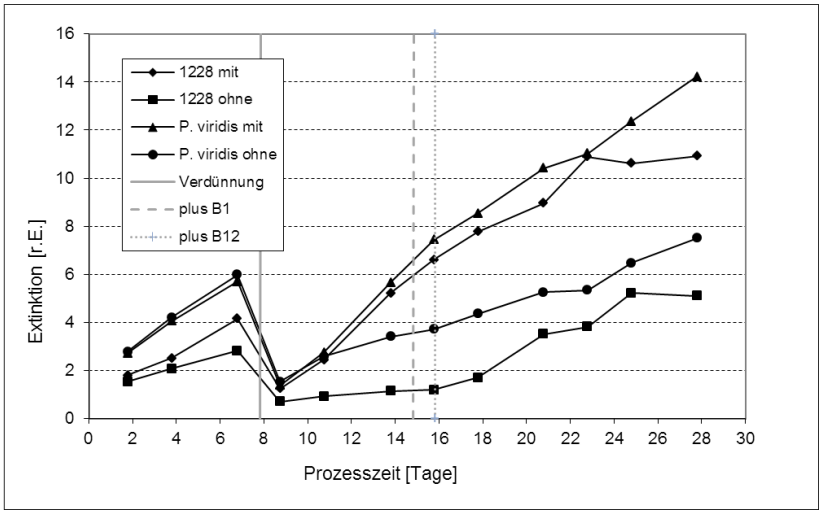

Abb. 31 Optische Dichte von CCMP 1228 und *P. viridis* in Abhängigkeit von Vitaminen im Medium

Da sich in diesem Versuch gezeigt hat, dass P. *viridis* und CCMP 1228 deutlich auf das Fehlen von Vitaminen im Medium ansprechen, wurden speziellere Vitaminversuche mit diesen *Pavlova*-Arten durchgeführt

3.2.4.2 P. *viridis* – erneuter Vitaminversuch

Für die genaueren Untersuchungen bezgl. der Notwendigkeit von Vitaminen im Medium wurden vier Versuchsreaktoren mit 2f-Medium angesetzt, dass folgende Vitaminkombinationen enthielt:

a) Vitamin B_{12}, B_1, Biotin (normales f-Medium)

b) Vitamin B_{12} und B_1

c) Vitamin B_{12}

d) ohne Vitamine (als Kontrolle ab dem 50. Versuchstag)

Der Wiederholungsversuch mit P. *viridis* unter Vitamin-Limitierung unterstreicht die im ersten Vitaminversuch erzielten Ergebnisse.

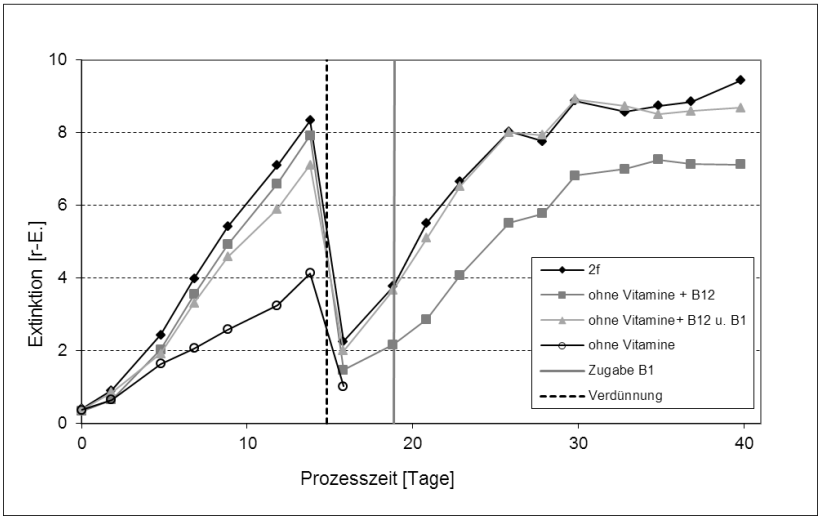

Abb. 32 Optische Dichte von P. *viridis* in Abhängigkeit von Vitaminen im Medium

Ohne Vitamine im Medium starb P. *viridis* ab (vgl. Abb. 32). Ein Medium ausschließlich mit B_{12} als Vitaminquelle ließ ein Wachstum nur im begrenzten Umfang zu (Yield sinkt, vgl. Abb. 33), nach Zugabe von B1 erholte sich die Alge recht schnell (Yield steigt wieder an, vgl. Abb. 33). Für P. *viridis* scheint es auszureichen, wenn dem Medium B_{12} und B_1 zugesetzt werden. Damit wächst sie genauso gut, wie in vollem f-Medium, welches zusätzlich noch Biotin (Vitamin B_7) enthält (vgl. Abb. 32).

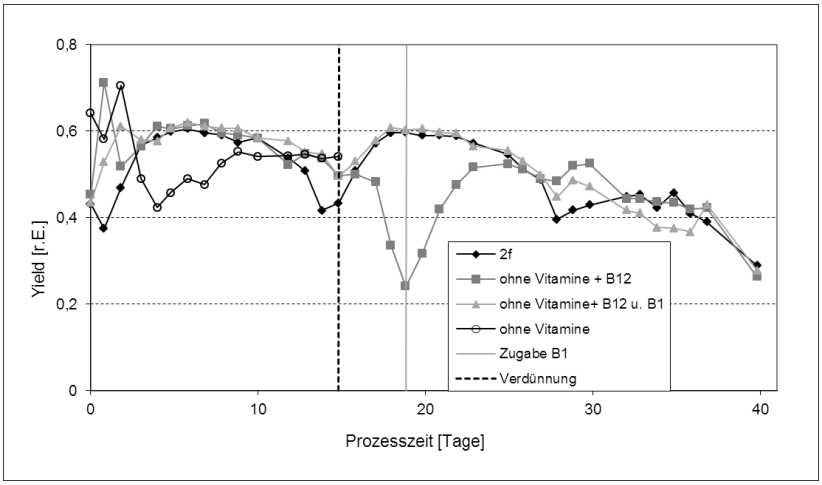

Abb. 33 Yield von P. *viridis* in Abhängigkeit von Vitaminen im Medium

3.2.4.3 CCMP 1228 – erneuter Vitaminversuch

Für CCMP 1228 wurde derselbe Versuchsaufbau verwendet, wie bei den Vitaminversuchen vorher. Auch hier wurde die Alge in Medium mit verschiedenen Vitaminkombinationen kultiviert.

Die Messungen der Optischen Dichte (Abb. 34) liefern folgendes Ergebnis:

Ein Wachstum von CCMP 1228 ohne Vitamine ist nicht möglich. Zwar nahm die OD dieses Ansatzes nach der ersten Verdünnung noch zu, nach der zweiten Verdünnung sank die OD bis zum Versuchsende, was auf ein Absterben der Kultur hindeutet. Die Betrachtung des Yields dieses Ansatzes unterstützt diese Aussage (vgl. Abb. 35). Dass in diesem Ansatz zunächst ein Wachstum zu verzeichnen war, liegt vermutlich an dem vitaminhaltigen Inokulum (100 ml Kultur + 400 ml Medium ohne Vitamine).

Es wird deutlich, das Vitamin B_{12} alleine nicht für ein optimales Wachstum von CCMP 1228 ausreicht – die Werte des Ansatzes mit B_{12} blieben unter denen vom Vitaminmix und dem Ansatz mit B_{12} und B_1. Kurz vor der dritten Verdünnung wurde dem B_{12}-Ansatz B_1 zugegeben und danach erreichte dieser Ansatz sogar die höchste OD von allen Versuchsansätzen. Dieses Ergebnis wird durch ähnliche Ergebnisse von CARVALHO, A.P et al. (2006) unterstützt, die dem Vitamin B_1 eine katalysierende Wirkung auf die B_{12}-Aufnahme von *P. lutheri* nachsagen.

Dass die maximale OD nach jeder Verdünnung (unabhängig vom jeweiligen Ansatz) niedriger als davor blieb, liegt vermutlich an der physiologischen Veränderung, die mit einer Verdünnung einhergeht: die Größenverteilung, Form und Pigmentkonzentration der Algenzellen kann sich dadurch ändern, was eine Veränderung der Lichtstreuung und Lichtabsorption der Algenkultur und damit eine veränderte (in diesem Falle verringerte) Extinktion am Photometer nach sich zieht.

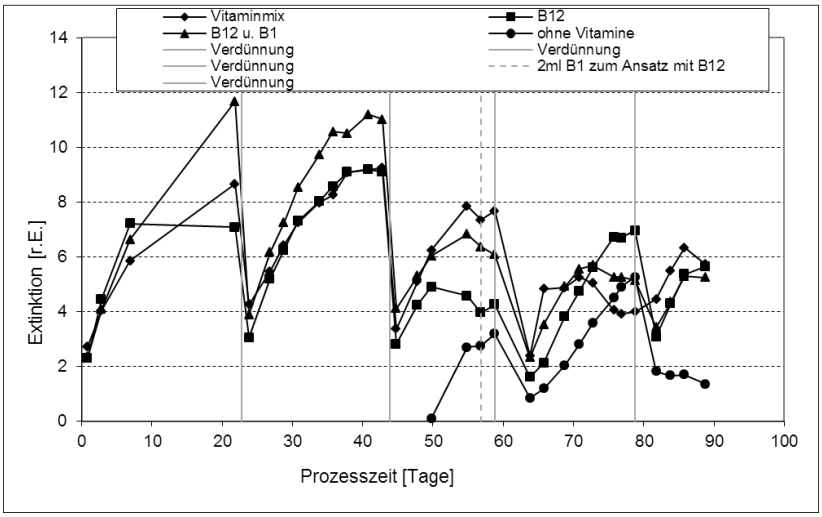

Abb. 34 Optische Dichte von CCMP 1228 in Abhängigkeit von Vitaminen im Medium

Auch die Ergebnisse der PAM-Messungen (Abb. 35) zeigen deutlich, dass *Pavlova* Vitamin B_{12} und B_1 im Medium benötigt. Zunächst lagen alle Yields dicht beisammen, nach der ersten Verdünnung begann der Yield des Ansatzes mit B_{12} bereits zu sinken, welches nach der zweiten Verdünnung noch deutlicher wurde. Als der Yield dieses Ansatzes bei ca. 0,14 lag (was auf einen sehr schlechten Zustand der Kultur hinweist) wurde B_1 hinzugegeben. Bereits kurz darauf (wenige Stunden, nicht dargestellt) wurde ein höherer Yield gemessen (0,25). Nach der Verdünnung stieg der Yield dann weiter stark an und erreichte vergleichbar hohe Werte wie die Ansätze mit allen Vitaminen bzw. mit Vitamin B_{12} und B_1.

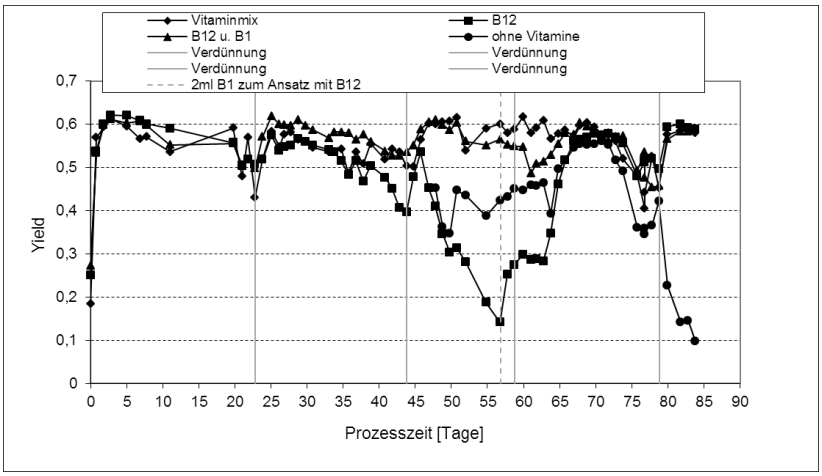

Abb. 35 Yield von CCMP 1228 in Abhängigkeit von Vitaminen im Medium

3.2.4.4 Versuche zur Stickstofflimitierung mit P. *viridis* und CCMP 1228

Ziel des Projektes ist - neben der optimierten Kultivierung einer geeigneten Futteralge – auch die Synthese von möglichst hohen Gehalten an EPA und DHA. Literaturangaben zufolge ist es möglich, dass durch Änderungen der Nährstoffzusammensetzung (insbesondere der Stickstoffkonzentration) des Mediums erhöhte EPA-Gehalte in Algenkulturen erzielt werden können (YONGMANITCHAI W. & WARD O. *P.*, *Appl. Environ. Microbiol.* 1991, 57(2):419-425; LI, M. GONG, R., RAO, X., LIU, Z., WANG, X., Annals of Microbiology, 55 (1), 51-55 (2005); HUANG, X., ZHENGZHENG, H., WEN W., YAN, J., J Appl Phycol, 2012)

In Versuchen mit *P. viridis* und CCMP 1228 sollte diese Hypothese verifiziert werden. Dazu wurde der Versuchsaufbau der Temperaturversuche modifiziert. Alle Bioreaktoren wurden auf dieselbe Temperatur eingestellt. Die vier Versuchsansätze wurden folgendermaßen angesetzt:

a) *P. viridis*, 2f-Medium

b) *P. viridis*, 2f-Medium ohne Stickstoff

c) CCMP 1228, 2f-Medium

d) CCMP 1228, 2f-Medium ohne Stickstoff

In Abb. 36 sind die Werte der PAM-Messungen dargestellt. Deutlich erkennbar ist der Abfall des Yieldes in den beiden stickstofffreien *Pavlova*-Kulturen. Nach der Zugabe von Stickstoff ($NaNO_3$, Konzentration 1f) erholten sich die Kulturen, was an dem Anstieg des Yields erkennbar ist.

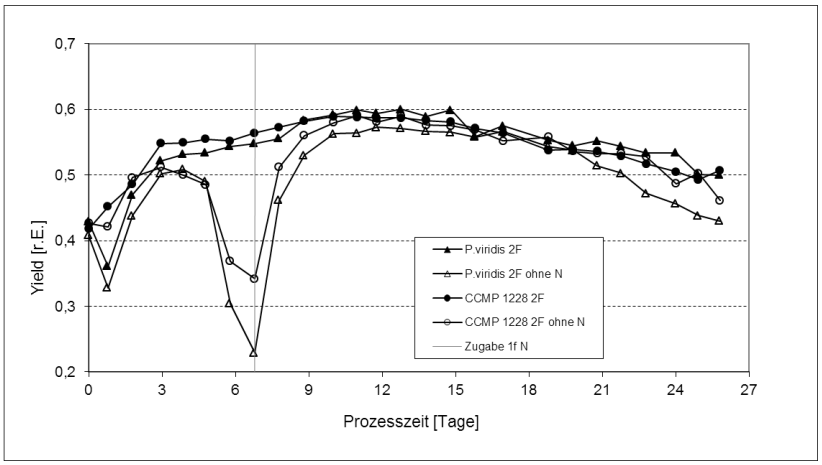

Abb. 36 Yield von *P. viridis* und CCMP 1228 unter Stickstofflimitierung

Auch in der Darstellung der Optischen Dichte (Abb. 37) ist das anfängliche Fehlen von Stickstoff erkennbar: die Werte der stickstofffreien Ansätze blieben hinter denen der jeweiligen Kontrollansätze zurück.

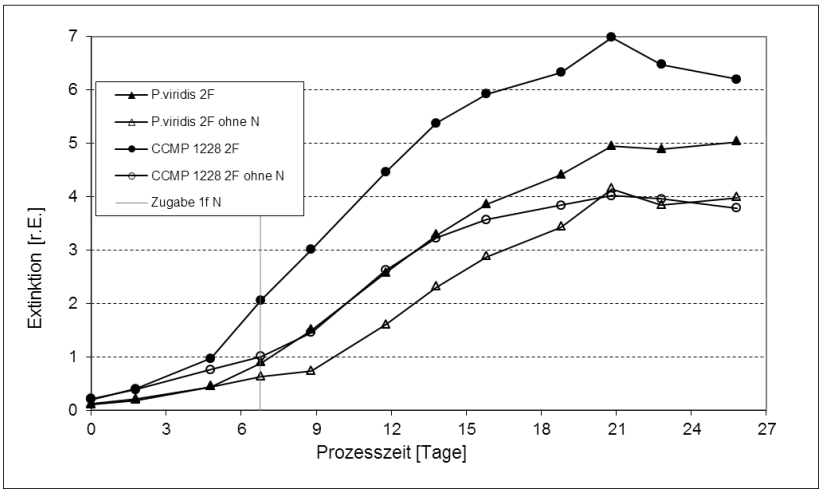

Abb. 37 Optische Dichte von *P. viridis* und CCMP 1228 unter Stickstofflimitierung

Die gaschromatographische Analyse der genommenen Proben weist keinen Einfluss vom Stickstoffangebot auf die Synthese von EPA oder DHA bei CCMP 1228 oder *P. viridis* nach. (vgl. Abb. 38). Allerdings zeigt sich, dass P. *viridis* in diesem Versuch deutlich mehr an diesen beiden Fettsäuren produziert als CCMP 1228.

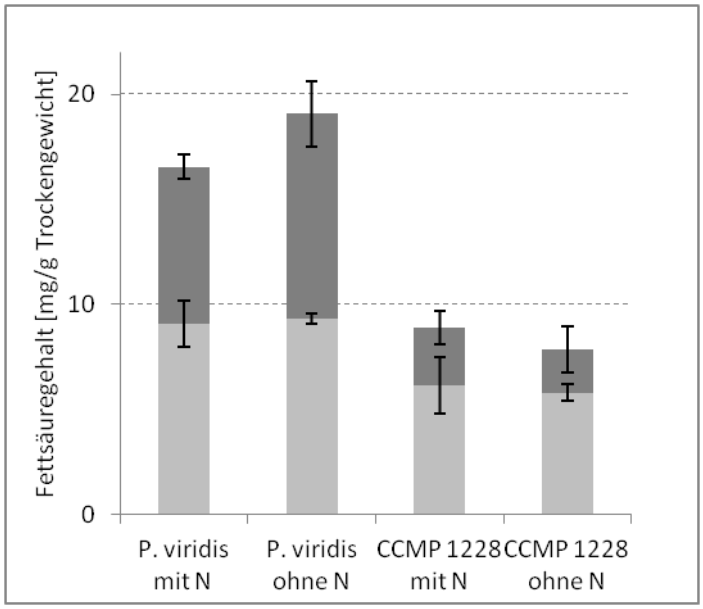

Abb. 38 EPA- und DHA-Gehalt von *P. viridis* und CCMP 1228 unter Stickstofflimitierung am Versuchsende

3.2.4.5 Versuch zur Stickstofflimitierung bei *P. viridis*

Da sich herausgestellt hat, dass Stickstoffmangel einen erheblichen Einfluss auf das Wachstum und die photosynthetischen Leistungen der Zellen von *P. viridis* hat, wurde ein weiterer Versuch zur Stickstofflimitierung durchgeführt.

Es wurden 2-Liter-Photobioreaktoren angesetzt, die unterschiedliche Konzentrationen (2f, 1f, ½ f, ¼ f) von $NaNO_3$ im Medium enthalten. Der pH-Wert und die Temperatur der Reaktoren wurden geregelt. Das Licht wurde in einem 12:12 Hell-Dunkel-Rhythmus gegeben. Im Verlauf des Versuches wurden desweiteren extreme Temperaturschwankungen simuliert.

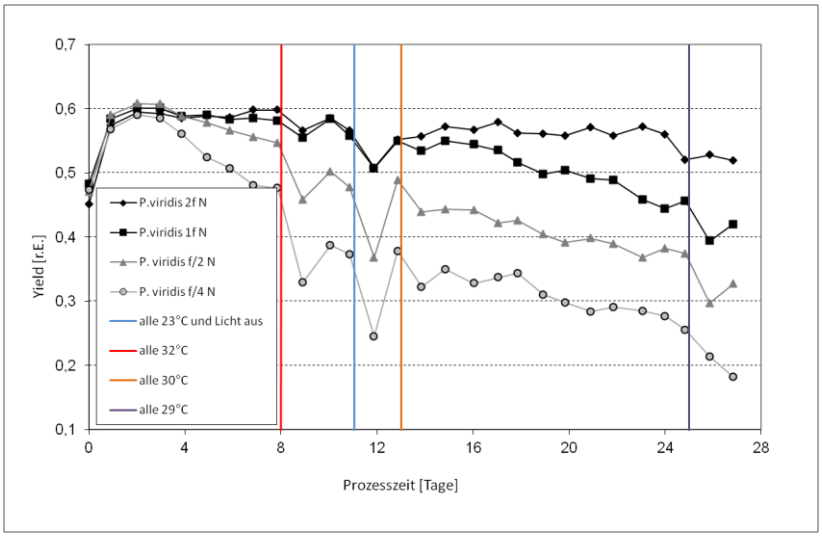

Abb. 39 Yield von *P. viridis* unter Stickstofflimitierung und bei Temperaturschwankungen

In Abb. 39 zeigt sich, dass die unterschiedlichen Stickstoffkonzentrationen zu einem entsprechend gestaffelten Verlauf des Yields über die Versuchsdauer führten. Während zwischen den Ansätzen mit 2f und 1f kein nennenswerter Unterschied im Yield zu verzeichnen ist, ist die photosynthetische Leistung der Zellen im Ansatz mit ½ f deutlich schlechter. Der Yield beginnt ab dem fünften Versuchstag an zu sinken. Im Ansatz mit ¼ f beginnt der Yield bereits am dritten Versuchstag abzusinken.

Auffällig ist zudem, dass die Ansätze mit ½ f und ¼ f wesentlich stärker von den kurzzeitig hohen Temperaturen beeinflusst werden als die anderen beiden, was ebenfalls auf einen schlechteren physiologischen Zustand schließen lässt.

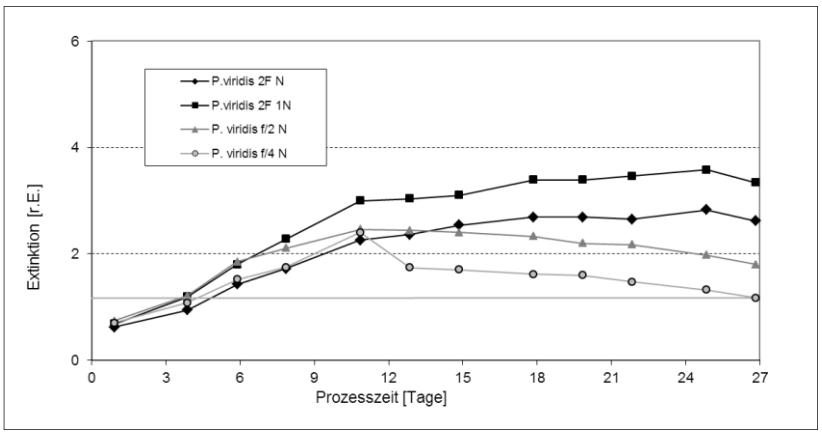

Abb. 40 Optische Dichte von *P. viridis* unter Stickstofflimitierung und bei Temperaturschwankungen

Die in Abb. 40 dargestellte OD der Versuchskulturen zeigt ebenfalls gut an, dass eine ausreichende Stickstoffversorgung für *Pavlova* unabdingbar ist. Die Ansätze mit ½ f und ¼ f nehmen zwar zunächst in der Optischen Dichte zu, ab dem elften Versuchstag beginnt dieser Parameter aber bei beiden Ansätzen zu sinken, während die OD der Ansätze mit 2f und 1f noch bis zum 24. Versuchstag langsam ansteigt.

Die Analyse der Fettsäuren gibt keinen Hinweis auf eine gesteigerte EPA-Synthese von P. *viridis* unter Stickstofflimitierung. In allen Versuchsansätzen nimmt der EPA-Gehalt über die Versuchsdauer gleichermaßen ab (vgl. Abb. 41).

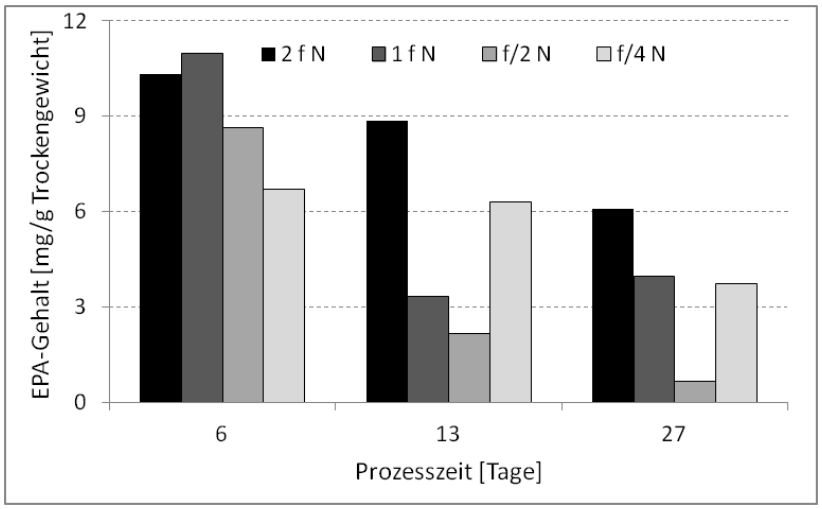

Abb. 41 EPA-Gehalt von *P. viridis* unter Stickstofflimitierung

Bei der Analyse des DHA-Gehaltes der Versuchsansätze konnten die Werte von f ½ f und ¼ f am letzten Versuchstag nicht bestimmt werden. Im 2f und 1f-Ansatz kam es auch bei dieser Fettsäure zu einer Abnahme über den zeitlichen Versuchsverlauf (vgl. Abb. 42).

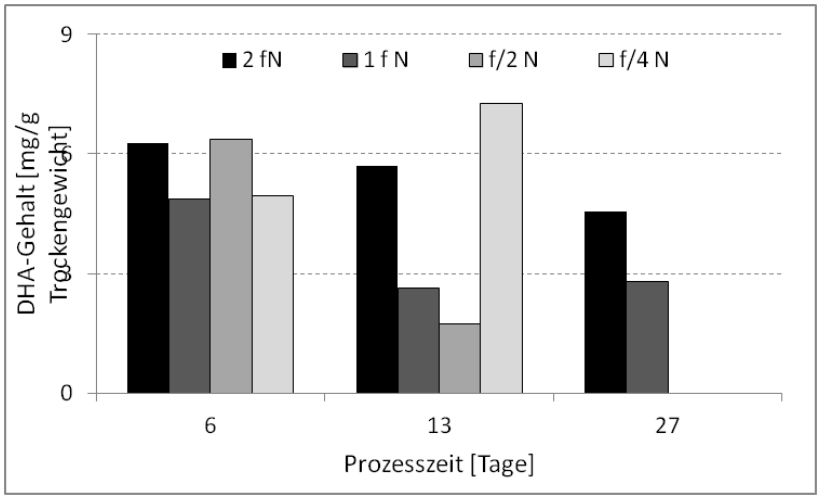

Abb. 42 DHA-Gehalt von *P. viridis* unter Stickstofflimitierung

3.3 Upscalen der *Pavlova viridis* Versuche auf 250 Liter Reaktoren

P. *viridis* hatte sich in den vorangegangenen Versuchen als unempfindlichste und haltbarste *Pavlova*-Art herausgestellt und dabei gegenüber CCMP 1228 eine bessere Synthese von EPA und DHA aufwiesen (vgl. Tabelle 2).

Daher wurde mit dieser Art ein Upscale-Versuch vorgenommen. Dazu wurde ein am FTZ Westküste vorhandener Photobioreaktor (250L, Abb. 43) mit 246 Litern 3f-Medium befüllt und anschließend mit weiteren vier Litern P. *viridis*- Kultur angeimpft. Der Reaktor wurde auf einen pH-Wert von 8,3 eingestellt. Die Temperatur wurde nicht geregelt, sondern bewegte sich aufgrund der Umgebungstemperatur zwischen 20°C und 22°C.

Als Nährstoffkonzentration wurde ein 3f Medium gewählt, um eine Limitierung durch Nährstoffmangel auszuschließen, da dieser Versuch eine besonders lange Versuchslaufzeit haben sollte.

Abb. **43 PAM-Messung an P. *viridis* am 250-Liter-Photobioreaktor am FTZ Westküste, Büsum (Foto: Vanselow)**

In dem Glasröhren-Photobioreaktor wuchs P. *viridis* sehr gut - es wurde eine optische Dichte von 11 erreicht (Abb. 44), was einer Biomasse von 1,5g/L entsprach. Diese hohen Werte beruhen hauptsächlich auf der durch die Glasröhren gegebenen, geringeren Schichtdicke der Kultur (5 cm Durchmesser, im Gegensatz zu 13 cm bei den 2-Liter-Photobioreaktoren) und den damit verbundenen besseren Lichtverhältnissen für die Zellen.

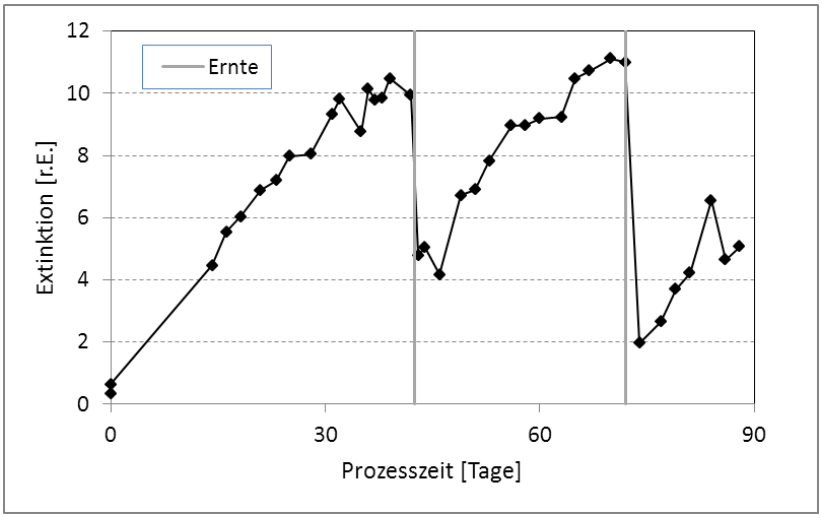

Abb. 44 Optische Dichte von P. *viridis* im 250-Liter-Photobioreaktor (Medium 3f)

Im Anschluss an diesen Versuch wurden weitere, größervolumige Kultivierungen von ausgewählten *Pavlova*-Arten angestrebt.
Im Vordergrund dieser Versuche stand die Produktion von möglichst viel Biomasse in unterschiedlichen Photobioreaktoren, die Ernte der Algenzellen mit geeigneter Erntemethode und Untersuchungen zu Haltbarkeit und Verarbeitung der geernteten Biomasse. Daneben wurden weitere Untersuchungen zur Fettsäurezusammensetzung und weitere Fütterungsversuche durchgeführt.

3.3.1 Allgemeines zu den großvolumigen Versuchen

Der erste entscheidende Unterschied zu den bis dahin durchgeführten Laborversuchen bestand darin, dass das verwendete Medium aufgrund der Menge (20 bis 350 Liter) nicht mehr autoklaviert werden konnte. Als Sterilisationsmethode wurde das Medium beim Befüllen der Bioreaktoren mit UVC-Licht bestrahlt und zusätzlich durch einen Ozonisator geleitet. Da das Medium durch diese Behandlung viele freie Radikale enthält, kann es auf empfindliche Phytoplanktonarten toxisch wirken. Daher wurde das Medium nach der Erstbefüllung der Bioreaktoren zunächst für ein bis zwei Tage „abklingen“ gelassen. Danach folgten drei Tage, in denen das Medium mit einem Luft-CO_2-Gemisch begast wurde um letzte schädliche Rückstände aus dem Medium auszutreiben. Erst danach wurde der Bioreaktor mit der ausgewählten *Pavlova*-Art angeimpft.

Aus Abb. 45 wird deutlich, dass die Sterilisation des Mediums mittels Ozons einen hemmenden Effekt auf *P. viridis* hat. Während im lediglich mit UVC-Licht behandelten Medium die Algen bereits nach 3 Tagen zu wachsen beginnen (Zunahme der OD), setzt bei den im ozonisierten Medium befindlichen Algen ein Wachstum erst nach 40 Tagen ein.

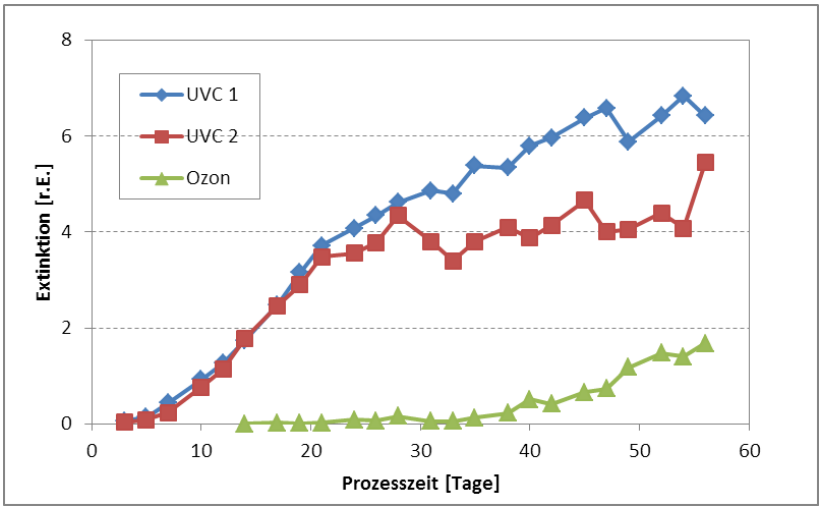

Abb. 45 Zunahme der Optischen Dichte von *P. viridis*, bei unterschiedlichen Sterilisationsmethoden des Mediums (UVC 1 = UVC-Lampe, 0,4 Liter Inokulum; UVC 2 = UVC-Lampe, 0,1 Liter Inokulum; Ozon = Ozonisator, 0,4 Liter Inokulum)

3.3.2 Maximal erreichte Biomassen

In Tabelle 3 sind alle maximal erreichten optischen Dichten der großvolumigen Versuche dargestellt. Aufgrund der vorangegangenen Untersuchungen an den unterschiedlichen *Pavlova*-Arten, wurde auf die Kultivierung der sehr temperaturempfindlichen Arten *P. lutheri* und CCMP 459 im Gewächshaus verzichtet. CCMP 609 konnte zwar in einem größervolumigen Bioreaktor (20 Liter) angesetzt werden, nach einem wetterbedingten Temperaturmaximum von über 32°C starb diese Kultur allerdings ab – es wurden keine weiteren Bioreaktoren mit dieser Art angesetzt.

Tabelle 3 maximal erreichte Optische Dichten der untersuchten *Pavlova*-Arten im Gewächshaus in unterschiedlichen Bioreaktoren (Volumen-Angabe)

Parameter Mikro algenart	350 Liter PE Halle	20 Liter PE GWH	20 Liter PE GWH	350 Liter GWH	Raceway GWH
CCMP 1228	2,5	3,9	-	6	-
P. viridis	4,3	3,9	9,8	4	3,5
***P.lutheri* (SAG 926-1)**	-	-	-	-	-
CCMP 459	-	-	-	-	-
CCMP 609	-	1,7	-	-	-

Die höchsten optischen Dichten wurden in den 20-Liter PE-Bioreaktoren im Gewächshaus mit *P. viridis* erzielt (9,8), was auf die geringere Schichtdicke dieser Reaktoren im Gegensatz zu den 350-Liter-Reaktoren, zurückzuführen ist.

Es zeigt sich, dass die Ods von P. *viridis* in den verwendeten 350-Liter-Bioreaktoren unter künstlichem bzw. Tageslicht annähernd gleich hoch sind, wobei CCMP 1228 im Gewächshaus eine höhere OD als P. *viridis* erreicht, unter künstlichem Licht aber nur eine geringere.

Eine Fragestellung im DBU-Projekt war, in wieweit sich *Pavlova* in einem (Fließgerinne) Raceway kultivieren lässt. Nach einer Vorlage von BBT entwarf Kunststoff-Spranger GmbH einen Raceway mit folgenden technischen Daten: Länge: 5 m, Breite: 1 m, Füllhöhe 22 cm, Volumen: 1000 Liter, Umwälzung der Kultur mittels Schaufelrad, pH-Regelung über geregelte CO2-Zugabe (vgl. Abb. 46, Abb. 47 und Abb. 48)

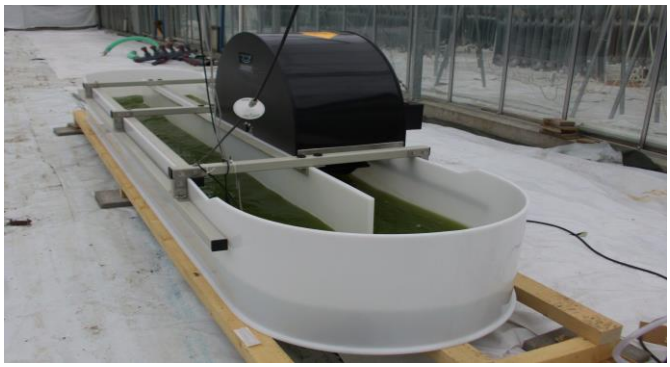

Abb. 46 Raceway mit *Pavlova viridis*

Abb. 47 Blick in den Raceway (Richtung Schaufelrad)

Abb. 48 Kurve des Raceways

P. viridis lässt sich in diesem offenen System bis zu einer OD von 3,5 zu kultivieren. Dieser etwas niedrigere Wert ist vermutlich auf die Schichtdicke zurückzuführen. Auch wenn durch die Strömungserzeugung über das Schaufelrad alle Zellen in die lichtreichen Zonen des Wasserkörpers

gelangen, ist doch deren Verweildauer dort gegenüber den PE-Reaktoren ungleich kürzer. Obwohl dieser Bioreaktor nach obenhin offen war, wurde innerhalb des zweimonatigen Betriebes keine übermäßige Verunreinigung oder Kontamination mit anderen Algenarten festgestellt.

Nicht dargestellt sind die Unterschiede, die durch die jahreszeitlichen Bedingungen hervorgerufen wurden: so wurden in den Gewächshaus-Versuchen, die im zeitigen Sommer angesetzt wurden, wesentlich höhere Ods erzielt, als in Ansätzen, die erst im Spätsommer gestartet wurden, was auf die im Frühsommer besseren Licht: Temperaturverhältnisse (viel Licht, gemäßigte Temperaturen) zurückzuführen ist.

3.3.3 Wachstumsraten im Vergleich: *P. viridis* zu *Nannochloropsis sp.*

Um einen Eindruck zu gewinnen, inwieweit sich P. virids für die Kultivierung unter Freilandbedingungen eignet, werden deren Wachstumsparameter mit denen von *Nannochloropsis sp.* verglichen – einer Alge, deren Einsatz in der Futtermittelindustrie eine feste Größe einnimmt.

Tabelle 4 Vergleich ausgewählter Wachstumsparameter von *P. viridis* und *Nannochloropsis sp.* unter annähernd gleichen Bedingungen

	Start OD	End OD	Zuwachs OD	Tage	OD/Tag	BTM [mg/l/d]
P. viridis	0,101	3,84	3,73	67	0,056	7,63
Nannochloropsis	0,433	13,76	13,33	67	0,199	35,80

Tabelle 4 zeigt verschiedene Wachstumsparameter von *P. viridis* und *Nannochloropsis sp.* unter gleichen Gewächshausbedingungen im Sommer 2013. Es wird deutlich, dass *Nannochloropsis* wesentlich höhere Zuwachsraten von OD und BTM pro Tag aufweist als *P. viridis*.

Da Licht-, Temperatur- und Nährstoffbedingungen gleich waren, stellte sich die Frage, ob *P. viridis* einen eventuell stark gesteigerten Nährstoffbedarf gegenüber *Nannochloropsis* hat und deshalb eventuell keine höheren Ods erzielte. Es wurde ein Versuch angesetzt, der diese Frage beantworten soll:

P. viridis wird unter konstanten (Labor-) Bedingungen mit unterschiedlichen Nährstoffkonzentrationen (4, 6 und 8f) kultiviert. Als Reaktoren dienten 1-Liter-Photobioreaktoren. Abb**.** 49 zeigt, dass eine 1,5- oder 2-fache Steigerung der Nährstoffe nicht zu einer gesteigerten Zunahme der OD von *P. viridis* führt.

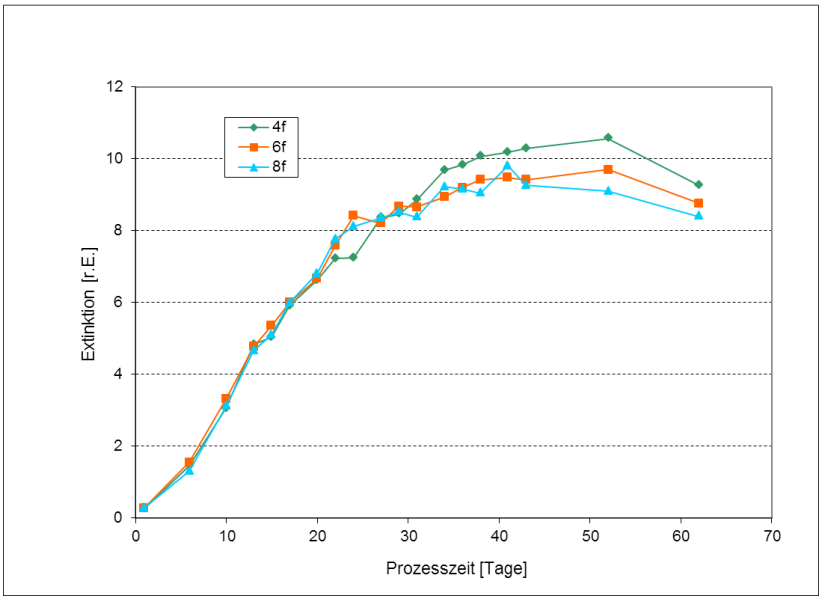

Abb. 49 Optische Dichte von *P. viridis* in Anhängigkeit der Nährstoffkonzentration

Auffällig sind die in diesem Versuch erreichten sehr hohen Ods (max.: 10), was erneut einen Hinweis auf den großen Einfluss des Lichtes auf das Wachstum diese Algenart gibt.

4 Ernte und Re-start der Bioreaktoren

Es wurden verschiedene Erntemethoden für *Pavlova* untersucht.

Sedimentation

Sedimentation ist prinzipiell die schonendste Erntemethode, da keine Scherkräfte auf die Algen einwirken. Die Algen sinken durch ihr Eigengewicht auf den Boden eines Absetzbehälters und das so entstandene Konzentrat kann abgesaugt werden. Da die Zellen von *Pavlova* relativ klein und zusätzlich beweglich sind, hat sich gezeigt, dass dieser Vorgang sehr lange dauert. Es musste bis zu 12h gewartet werden um zufriedenstellende Mengen zu ernten. Ein Teil der Kultur war dabei so beweglich, dass er auf diese Weise nicht zu ernten war und im späteren Prozess in die Kultivierung zurückgeführt werden musste. Dies bedeutet besonders im Hinblick auf die Steriltechnik einige Probleme.

Flokkulation

Eine Intensivierung der Sedimentation erreicht man durch die Zugabe von Flokkulationsmitteln. Diese bewirken, dass die Zellen in Gruppen zusammenlagern und dadurch schneller absinken. Da für die Verwendung als Futtermittel in der Aquakultur chemische Zusatzstoffe wie z.B. Aluminiumsalze (prinzipiell hervorragende

Flokkulationsmittel) nicht in Frage kommen, wurden Experimente mit Erhöhung des pH Wertes durchgeführt. Eine Erhöhung des pH Wertes auf ca. 10,5 bewirkt die Bildung von Magnesium- und Calciumcarbonat-Kristallen im Wasser. An diese Kristalle lagern sich die Algen an und beginnen abzusinken. Die Sedimentationszeiten konnten deutlich reduziert werden (1-2h). Die Methode ist prinzipiell geeignet um die Algenzellen zu ernten. Mikroskopisch waren die *Pavlova*-Zellen durch den erhöhten pH Wert nicht beeinträchtigt.

Zentrifugation

Die Zentrifugation bewirkt prinzipiell starke Scherkräfte auf die Algen. In einer normalen Durchlaufzentrifuge wurden über 50% der Zellen geschädigt. Die Ausbeute konnte gesteigert werden indem die Drehzahl der Zentrifuge (und damit die Scherkräfte) reduziert wurde. Dabei sinkt aber deutlich der Durchsatz und die Maschinen müssten deutlich größer werden bzw. die Erntemenge pro Zeit sinkt. Beides macht den Ernteprozess sehr teuer und wirtschaftlich evtl. uninteressant.

Im weiteren Verlauf wurden mit dem Zentrifugen-Hersteller weitere Modifikationen in der Flüssigkeitsführung in der Zentrifuge vorgenommen, um den Durchsatz bei weiterhin niedrigen Drehzahlen zu erhöhen.

Prinzipiell zeigte sich die modifizierte Zentrifugation als upscale-fähige und zuverlässige Erntemethode für *Pavlova*.

Für die ersten Fütterungsversuche an der GMA konnten so die erforderlichen Mengen an *Pavlova*-Konzentrat hergestellt werden.

Filtration

Die Versuche mit Filtration verliefen prinzipiell erfolgreich. Bei geeigneter Porengröße der Membran konnten die Algen zerstörungsfrei und schnell geerntet werden. Dabei kamen zunächst Versuchsaufbauten mit Filtermembranen mit 5-15cm Durchmessen zum Einsatz. Die Algensuspension wurde durch Unterdruck durch die Membran gesaugt.

Allerdings zeigten sich auch sehr bald die verfahrenstechnisch bedingten Probleme bei der Filtration. Die Membran setzte sich nach einer gewissen Menge an auffiltrierten Algen zu, so dass der Durchsatz rapide zurückging und auch ganz zum Erliegen kam. Zur Lösung des Problems wurden verschiedene Hersteller von Filtrationsverfahren konsultiert. Die verschiedenen verfügbaren Verfahren beruhen alle auf einer Reinigung der Membran bzw. einem Abtrag des aufgebauten Filterkuchens währen der laufenden Filtration. Im Hinblick auf eine spätere wirtschaftliche Durchführung der Ernte im Produktionsmaßstab erschien vor allem das sogenannte „Cross-flow-Verfahren“ realisierbar. Nach umfangreichen Vorversuchen zeigte sich allerdings, dass die dabei zur Überströmung der Filtrationsmembran notwendigen Pumpen zwangsläufig so starke Scherkräfte erzeugen, dass die prinzipiellen Vorteile der Filtration durch die Nachteile der starken Scherkräfte zunichte gemacht werden.

Letztendlich stellte sich die Zentrifugation als geeignetste Erntemethode heraus. Zur Ernte der Algenbiomasse wird die Kultur aus dem Bioreaktor abgepumpt und in eine Zentrifuge geleitet. Die Zellen verbleiben dabei in dem in der Zentrifuge rotierenden Zylinder, während das Kulturmedium wieder abgeführt wird. Dieser Rücklauf wird mit neuen Nährstoffen versetzt und dann wieder über UVC-Lampe und Ozonisator zurück in den Bioreaktor gepumpt.

5 Kultivierung von Lebendfutterorganismen (*Brachionus plicatilis*)

Zunächst wurde in einem kleinskaligen Futterexperiment untersucht, in wieweit *Pavlova* für *Brachionus* als Futtermittel geeignet ist.

Es wurden fünf verschiedene Algenpräparate getestet

1) Hefe
2) *Nannochloropsis sp.* Konzentrat
3) *Pavlova sp*. Frischkultur
4) *Pavlova viridis* Konzentrat
5) *Pavlova viridis* Frischkultur

Die Rädertierchen wurden in 30 l Tanks mit einer Kombination aus Bäckerhefe und *Nannochloropsis*-Konzentrat kultiviert. Zu Beginn des Versuchs wurden die Rädertierchen mit einer Startdichte von 30 ind ml-1 auf 5x4 1-Liter Flaschen aufgeteilt (vgl. Abb. 50). Über den 14-tägigen Versuchszeitraum wurden Temperatur (22,5±0,7°C) und Salinität (20 PSU) konstant gehalten und es wurde eine 24h Beleuchtungsperiode eingestellt.

Abb. 50 Kultivierung von *Brachionus plicatilis* im Klimaschrank

Jedes Futtermittel wurde täglich auf einer Basis von 0,8g Trockenmasse pro $1*10^6$ ind verabreicht. Täglich wurden Proben für die Bestimmung der Individuendichte und Eianzahl genommen und mit Jod-Kaliumjodidlösung nach Lugol fixiert.
Die Ergebnisse zeigten positive Effekte der *Pavlova*-Produkte auf die Entwicklung der Rädertierchen (Abb. 51) im Vergleich zu dem *Nannochloropsis*-Konzentrat und der Hefe. Vor allem der *Pavlova viridis*-Stamm erzielte gute Ergebnisse und konnte zudem auch als Konzentrat angeboten werden.

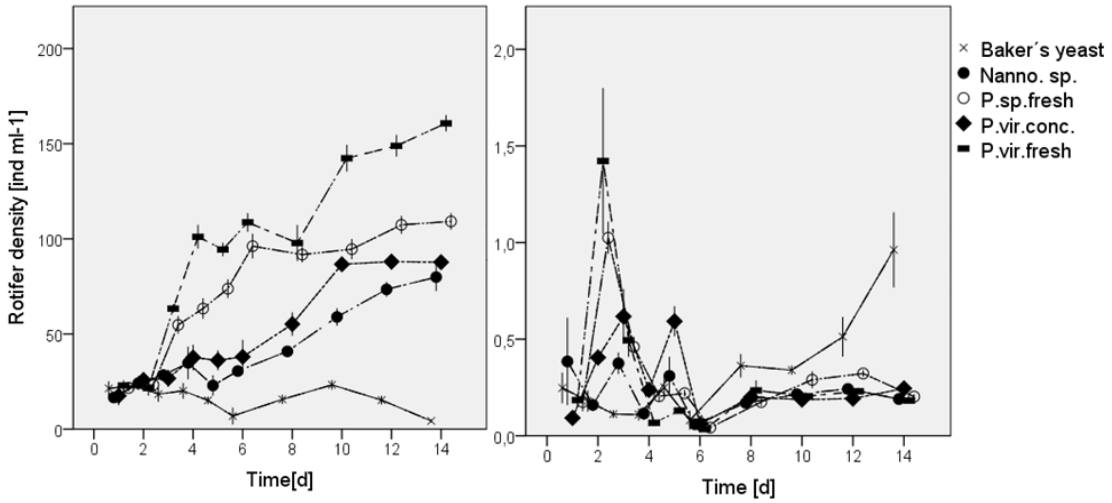

Abb. 51 Entwickungsverlauf der Rädertierchenkulturen in Abhängigkeit der Testprodukte: Bäckerhefe, *Nannochloropsis* sp. Konzentrat, *Pavlova* sp. Frischkultur, *Pavlova* viridis Konzentrat und *Pavlova* viridis Frischkultur (Mittelwert+/-Standardabweichung, n=4)

In den weiteren Folgeversuchen zur Kultivierung von Rädertierchen wurden verschiedene Verarbeitungs- und Konservierungsformen (Flüssigkonzentrat, unbehandelte Algenbiomasse, gefrorenes Flüssigkonzentrat, Lyophilisat) von *Pavlova viridis* getestet. Neben diesen vier Produkten wurde erneut Konzentrat von *Nannochloropsis* sp. als Kontrollprodukt eingesetzt. Jedes Produkt wurde in fünffacher Wiederholung auf einer Basis von 0,75g Trockenmasse pro $1*10^6$ Individuen verabreicht.

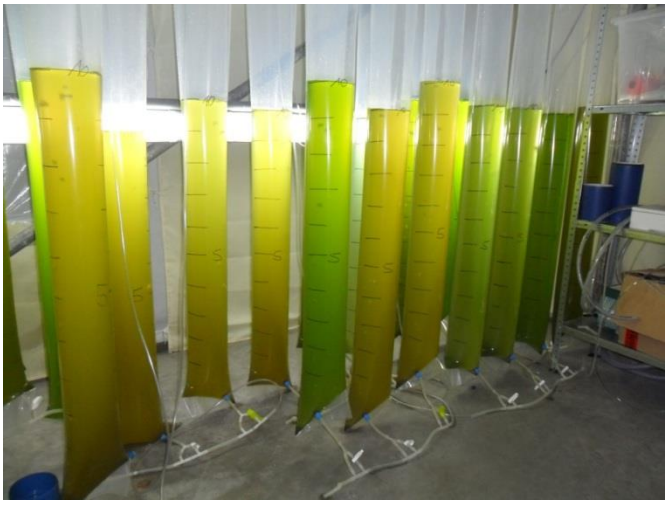

Abb. 52 PE-Säcke mit *Brachionus*-Kulturen nach der Fütterung

Die Temperatur (21,4±0,2°C) und die Salinität (20PSU) wurden während der 14tägigen Versuchsdauer konstant gehalten und es wurde eine Beleuchtungsperiode von 24h eingestellt. Die Rädertierchen wurden in 30 L Tanks mit einer Kombination aus Bäckerhefe und *Nannochloropsis* sp.

Konzentrat kultiviert. Zu Beginn des Versuchs wurden die Rädertierchen mit einer Startdichte von 100 ind ml^{-1} auf 5x5 PE-Säcke (Volumen 10 Liter) aufgeteilt.

Es wurde täglich ein Volumen von 1,5L aus jedem Versuchsansatz entnommen. Daraus wurden Proben für die Analyse der Populationsentwicklung (Individuen- und Eianzahl) entnommen. Zusätzlich wurde täglich die Algenkonzentration vor der Fütterung durch Messung der optischen Dichte bestimmt. Am fünften und zwölften Versuchstag wurde die Algenkonzentration in den Kulturen in sieben aufeinanderfolgenden Stunden und erneut nach 20 Stunden gemessen, um die Filtrations- und Ingestionsraten zu bestimmen. Um ein mögliches Absinken der Algen zu berücksichtigen (welches bei Nichtbeachtung zu einer Überschätzung beider Raten führen könnte), wurden zusätzliche Messungen der Produktkonzentrationen in einem Versuchsaufbau ohne Rädertierchen gemessen. Die Filtrations- und Ingestionsraten wurden wie folgt berechnet (Yúfera and Pascual 1985):

$F = (\ln C_0 - \ln C_t)/N \times t$,

wobei F = Filtrationsrate in ml ind^{-1} min^{-1}, C_0 = die initiale Produktkonzentration in µg DW (Dry weight = Trockenmasse) ml^{-1}, C_t = die finale Produktkonzentration in µg DW ml^{-1}, N = die Rädertierchendichte in ind ml^{-1}, und t = die Zeit der Behandlung in min, und

$I = F \times \sqrt{C_0} \times C_t$,

I = Ingestionsrate des konsumierten Produkts in µg DW min^{-1} ist.

Das Kulturvolumen wurde nach der Probennahme inklusive der täglichen Algenration wieder auf 10L aufgefüllt.

Die ersten Ergebnisse zeigen unterschiedliche Effekte der verschiedenen *Pavlova*-Produkte (Abb. 53). Das Flüssigkonzentrat von *Pavlova viridis* zeigt insgesamt positive Effekte auf den Verlauf der *Brachionus*-Kultur. Dennoch zeigten sich Unterschiede innerhalb der fünf Wiederholungen. Der Zusammenbruch einer der fünf Kulturen gegen Ende des Versuchs bedingte die hohen Standardabweichungen, v.a. ab dem zehnten Versuchstag. Des Weiteren waren bei diesem Produkt nach ca. zehn Tagen Veränderungen in Farbe und Geruch zu verzeichnen, welche auf eine schlechtere Haltbarkeit des *Pavlova*-Konzentrats bei Lagerung bei 4°C hindeuten. Die unbehandelte Algenbiomasse von *Pavlova viridis* ergab über den gesamten Versuchszeitraum ein gutes Kulturwachstum, ebenso wie das gefrorene Flüssigkonzentrat dieser Alge. Die mit dem Lyophilisat von *Pavlova viridis* gefütterten Kulturen zeigten hingegen über den gesamten Zeitraum kaum/kein Wachstum.

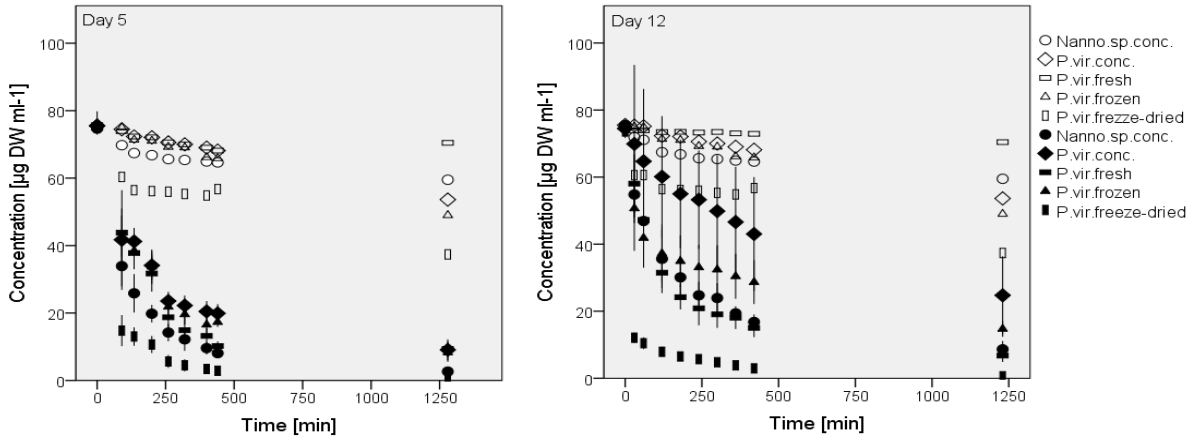

Abb. 53 Entwickungsverlauf der Rädertierchenkulturen in Abhängigkeit der Testprodukte: *Nannochloropsis* sp. Konzentrat; *Pavlova viridis* - Konzentrat, *P. viridis* – gefriergetrocknetes Pulver, *P. viridis* - Frischkultur, *P. viridis*– gefrorenes Konzentrat (Mittelwert+/-Standardabweichung, n=5).

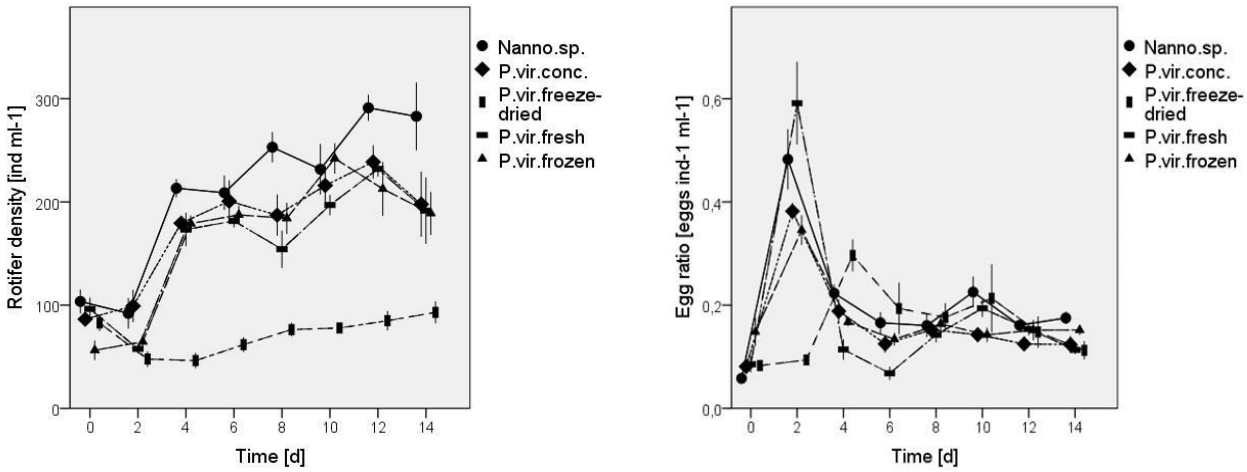

Abb. 54 : Algenkonzentration gemessen an Tag 5 und 12 über einen Zeitraum von 20 Stunden. Die offenen Symbole stehen für die Vergleichswerte der Produkte-gemessen in einem Versuchsaufbau ohne Rädertierchen, die geschlossenen Symbole stehen für die Werte gemessen in den Rädertierchenkulturen (Mittelwert+/-Standardabweichung, n=5).

Tabelle 5 Filtrations- und Ingestionsraten der verschiedenen Futterprodukte am fünften und zwölften Versuchstag im Vergleich

Tag 5	Filtrationsrate [ml ind^{-1} min^{-1}]	Ingestionsrate [µg DW min^{-1}]
Nanno.sp. Konz.	$1.258*10^{-5}\pm7.826*10^{-7\ a}$	$1.751*10^{-4}\pm6.822*10^{-6}$
P.vir. Konz.	$8.44*10^{-6}\pm1.416*10^{-6\ a}$	$2.131*10^{-4}\pm4.093*10^{-6}$
P.vir. Frisch	$9.112*10^{-6}\pm1.067*10^{-6\ a}$	$2.38*10^{-4}\pm2.718*10^{-6}$
P.vir. gefroren	$9.407*10^{-6}\pm1.295*10^{-6\ a}$	$2.304*10^{-4}\pm9.497*10^{-6}$
P.vir. Lyophilisat	$9.848*10^{-5}\pm2.567*10^{-5\ b}$	$1.828*10^{-4}\pm1.557*10^{-4}$
Tag 12		
Nanno.sp. Konz.	$5.222*10^{-6}\pm6.85*10^{-7\ a,b}$	$1.85*10^{-4}\pm1.993*10^{-5\ a}$
P.vir. Konz.	$3.421*10^{-6}\pm1.088*10^{-6\ a}$	$1.825*10^{-4}\pm3.886*10^{-5\ a}$
P.vir. Frisch	$6.774*10^{-6}\pm7.474*10^{-7\ b}$	$2.286*10^{-4}\pm4.415*10^{-5\ a}$
P.vir. gefroren	$4.595*10^{-6}\pm5.218*10^{-7\ a,b}$	$2.098*10^{-4}\pm2.287*10^{-5\ a}$
P.vir. Lyophilisat	$3.973*10^{-5}\pm3.565*10^{-6\ c}$	$5.803*10^{-4}\pm8.557*10^{-5\ b}$

Die Gruppe, die mit dem gefriergetrockneten *Pavlova*-Pulver gefüttert wurde, zeigte deutlich höhere Filtrationsraten im Vergleich zu den anderen Gruppen sowohl am fünften, als auch am zwölften Tag. Bei Betrachtung der Vergleichswerte (ohne Rädertierchen), ist zu erkennen, dass dies nur auf dem erhöhten Absinken dieser Partikel, nicht auf der Aufnahme durch die Rädertierchen, beruht. Um die Filtrations- und Ingestionsraten zu vergleichen, müssen also die Vergleichswerte (ohne Rädertierchen) mit betrachtet werden. Nichtsdestotrotz zeigte die *Pavlova*-Konzentrat-Gruppe eine deutlich niedrigere Filtrationsrate am zwölften Tag. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es keine deutlichen Unterschiede in der Akzeptanz der Testprodukte gab. Die niedrigeren Aufnahmeraten des *Pavlova*-Konzentrats an zwölften Tag sind auf die schlechtere Haltbarkeit dieses Produkts zurückzuführen.

Insgesamt erscheint v.a. das gefrorene Konzentrat geeignet für die Kultivierung von Rädertierchen. Es war einfach in der Anwendung, zeigte eine gute Haltbarkeit (bei Lagerung bei -20°C) und erzielte gute Wachstumsergebnisse der Rädertierchen und wurde von ihnen als Nahrung gut aufgenommen.

6 Fischlarvenernährung

Die Aufzucht und Fütterung der Fischlarven ist die kritischste Phase in der Produktion mariner Fische. Die Larven stellen sehr spezielle Anforderungen an ihre Nahrung. Im natürlichen Lebensraum nehmen marine Fischlarven bewegliches Zooplankton auf. Dieses kann durch die vorherige Aufnahme von anderen Organismen (u.a. Mikroalgen) die geeigneten Nährstoffe liefern. Viele marine Fischlarven nehmen nur sehr schlecht bzw. kein inertes Trockenfutter an. Deshalb ist es notwendig die Larven auch in der Aquakultur mit Lebendfutter zu versorgen (Bengston 2003). Die in der Fischlarvenaufzucht am häufigsten genutzten Lebendfutterorganismen, Rotatorien und Artemien, enthalten per se nicht die nötigen Nährstoffe, weshalb es notwendig ist, sie mit diesen Stoffen anzureichern. Besonders wichtig scheinen hierbei Lipide und v.a. die essentiellen Fettsäuren zu sein, die einen starken Einfluss auf das Wachstum und die Überlebensraten der Larven haben (Izquierdo et al. 2000). Um den Nährstoff- und v.a. Fettsäurebedarf der Larven zu decken, werden häufig Mikroalgenmischungen als Anreicherung für die Lebendfuttertiere genutzt, da bisher keine Alge

allein alle Ansprüche erfüllen konnte. Vor diesem Hintergrund scheint besonders die Mikroalge *Pavlova* als Anreicherungsprodukt für Lebendfutterorganismen geeignet zu sein, da sie sich dadurch auszeichnet beide - für marine Fische essentiellen - Fettsäuren (Docosahexaensäure (DHA) und Eicosapentaensäure (EPA)) zu enthalten (Patil et al. 2007). Um das Potential von *Pavlova* in der Fischlarvenernährung zu testen, wurden in einem sechswöchigen Versuch Rotatorien und anschließend Artemien mit *Pavlova* angereichert und zur Ernährung von Kabeljaularven (*Gadus morhua*) verwendet (dreifacher Ansatz). Zum Vergleich wurden auch die Mikroalge *Nannochloropsis* und das kommerzielle Anreicherungsprodukt „Multigain®“ (BioMar, Dänemark) getestet. Nach 34 Tagen wurden alle Versuchsgruppen erfolgreich an Trockenfuttermittel („Gemma micro®“, Skretting, Norwegen) gewöhnt (Tabelle 1).
Es wurden Proben für Standardlänge und Trockengewicht der Larven an Tag 0, 3, 6, 12, 18, 24, 30, 36 und 42 entnommen. Alle Larven wurden mit MS222 (3-Aminobenzoesäure-Ethylester-Methansulfonat) betäubt und mit destilliertem Wasser gereinigt bevor sie weitergehend untersucht wurden.
Die spezifische Wachstumsrate (SWR) und die prozentuale tägliche Gewichtszunahme (TGZ) wurden nach Kjørsvik et al. (2007) berechnet:

$SWR=\ln (W_t-W_o)/t$
$\%TGZ= (e^{SGR}-1)*100\%$,

W_t = finales Gewicht zum Zeitpunkt t , W_o = Gewicht zum Startzeitpunkt, t = Anzahl der Tage in Periode der spezifischen Wachstumsrate

Basierend auf der Anzahl toter Larven, die täglich ab Tag 21 entnommen wurden, wurde die Mortalität bzw. Überlebensrate bestimmt.

Tabelle 6 Parameter des Fischlarvenversuches

Tag (Alter)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11-18	19	20	21	22	23	24	25	26-32	33	34	35	36	37	38	39-42
Temperatur [°C]	7	7	8	8	9	9	9	10	10	11	11	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Licht*	D	D	D	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
Belüftung	Schwach				stark																						
Wasseraus-tauschrate [Tag^{-1}]	2	2	2	2	2	4	4	4	4	4	4	4	6	6	6	6	8	8	8	8	8	8	8	10	10	10	10
Rotatorien [Fütterung Tag^{-1}]				2	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2										
Artemien [Fütterung Tag^{-1}]													1	1	1	1	2	4	4	4	4	4	4	3	2	1	
Trockenfutter [g Tank^{-1}]																					3	3	6	6	8	8	10
Tonzugabe/ Trübung				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X									

Abb. 55 Versuchsaufbau-Kabeljaularvenversuch (links) und Artemienerbrütungs- bzw. Artemienanreicherungssystem (rechts)

Erste Ergebnisse zum Wachstum der Fischlarven in Abhängigkeit der unterschiedlichen Anreichungsprodukte konnten zeigen, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen dem kommerziellen Produkt und der Alge *Pavlova* gibt (Abb. 56). Die Alge *Nannochloropsis* bewirkte ein deutlich schlechteres Wachstum, höchstwahrscheinlich aufgrund des unzureichenden Fettsäureangebots, da diese Alge zwar große Mengen an EPA enthält, dafür aber kein DHA (Patil et al. 2007).

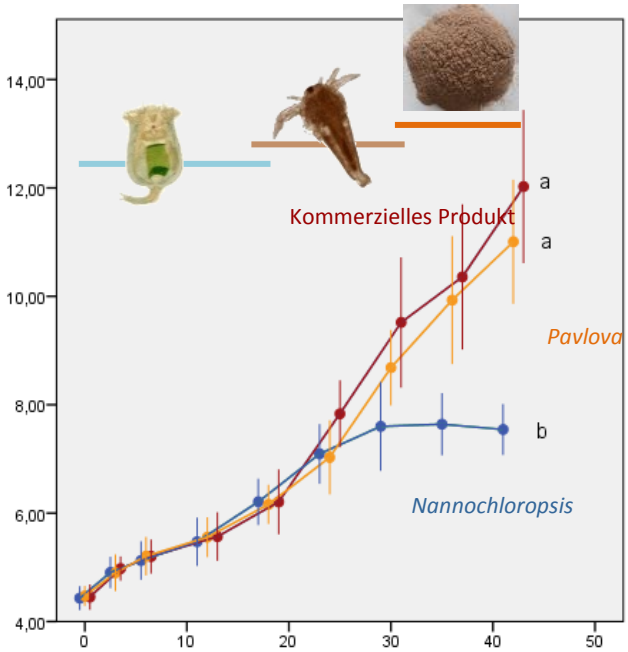

Abb. 56 : Wachstum der 3 Versuchsgruppen (Anreicherung mit einem kommerziellen Produkt, *Pavlova* und *Nannochloropsis*, je Gruppe n=3) über den Versuchszeitraum von 42 Tagen

Die prozentuale tägliche Gewichtszunahme der Kabeljaularven beschreibt den gleichen Trend wie die spezifische Wachstumsrate (Tabelle 7).

Die 100%-ige Mortalität der mit *Nannochloropsis* gefütterten Larven ist ebenfalls auf die Fettsäure-(DHA-) Limitierung zurückzuführen (Tabelle 7). Auch bei den mit *Pavlova* gefütterten Larven ist eine

hohe Mortalität zu verzeichnen, die vermutlich auch auf eine Limitierung wichtiger Nährstoffe zurückzuführen ist. Im Gegensatz zu den beiden Algenprodukten, zeigte die Multigain-Gruppe eine signifikant höhere Überlebensrate. Da nur dieses Produkt aus verschiedenen Bestandteilen zusammengesetzt war und somit speziell an die Anforderungen der Larven angepasst wurde, kann hier von einer ausreichenden Versorgung mit den wichtigen Nährstoffen ausgegangen werden. Vor diesem Hintergrund ist das Ergebnis der *Pavlova*-Gruppe somit trotzdem als positiv zu bewerten, da *Pavlova* als Anreicherungsprodukt – ohne weitere Zusätze - zumindest ein ähnlich hohe spez. Wachstumsrate wie das kommerzielle Produkt liefern konnte. Somit könnte *Pavlova* zum Beispiel auch als Zusatz zu Anreichungsprodukten geeignet sein, um die essentiellen Fettsäuren beizutragen.

Tabelle 7 Wachstumsverlauf und Überlebensrate der Kabeljaularven (n=3).

	IKG[1]	FKG[2]	SWR[3]	TGZ[4]	Überlebensrate[5]
Nannochloropsis sp.	0.056±0.017	0.305±0.080 [a]	0.040±0.009 [a]	4.135±0.983 [a]	0.0±0.0 [a]
Pavlova viridis	0.057±0.012	1.278±0.346 [a,b]	0.073±0.009 [b]	7.617±0.931 [b]	6.47±2.02 [a]
Commercial product	0.058±0.010	1.716±0.819 [b]	0.079±0.010 [b]	8.186±1.069 [b]	19.65±7.51 [b]

1 Initiales Körpergewicht (mg)
2 Finales Körpergewicht(mg)
3 Spezifische Wachstumsrate (Tag^{-1})
4 Tägliche Gewichtszunahme (% Tag^{-1})
5 Überlebensrate (%)

7 Mikroalgen im Fischfutter

Ein weiterer Verwendungszweck für Mikroalgen ist der Einsatz als alternative Nährstoffquelle in Trockenfuttermitteln für adulte Fische. Hierbei werden vor allem Fischmehl oder Fischöl im Fischfutter durch Algenprodukte ersetzt. Tartiel et al. (2008) und Walker and Berlinsky (2011) zeigten zum Beispiel, dass *Chlorella*- und *Scenedesmus*- Algen im Futter für Tilapien und *Nannochloropsis* und *Isochrysis* im Futter für Kabeljau erfolgreich Anteile des Fischmehls ersetzen konnten.

Als Fischölersatz wurden bisher vor allem verschiedene Pflanzenöle, wie Raps-, Leinsamen- oder Sojaöl, getestet und konnten bis zu einem Austausch von 50-65 % des Fischöls als geeignet für marine Fischarten eingestuft werden (Bell et al. 2003, Figueiredo-Silva et al. 2005, Mourente and Bell 2006). Höhere Austauschraten sind aufgrund des Fehlens der hochungesättigten Fettsäuren EPA und DHA in der Ernährung von marinen Fischarten nicht möglich. Zudem können Faktoren wie antinutritive Stoffe, ein unausgewogenes Fettsäureverhältnis, Veränderung im Geschmack und eine schlechte Verdaulichkeit die Anwendbarkeit von pflanzlichen Ölquellen einschränken (Regost et al. 2003). Vor diesem Hintergrund wurden verschiedene Futtermittel für junge Wolfsbarsche hergestellt, in denen 0%, 50% und 100% des Fischöls durch *Pavlova* (P50 und P100) und *Nannochloropsis* (N50 und N100) ausgetauscht wurden. Im basalen Futtermittel selbst wurden schon 60% des Gesamtfettanteils aus pflanzlichen Ölquellen sichergestellt, um so ein kommerzielles Wolfsbarschfutter nachzustellen. Im Kontrollfuttermittel diente das Fischöl als alleinige Hauptfettquelle (Tabelle 8).

Tabelle 8 Fettquellenzusammensetzung der experimentellen Futtermittel

	Fischöl	*Pavlova*	*Nanno.*	Sonnen-blumenöl	Rapsöl	Lein-samenöl
Kontrolle	100%	-	-	-	-	-
Basal	40%	-	-	20%	20%	20%
P50	20%	20%	-	20%	20%	20%
P100	-	40%	-	20%	20%	20%
N50	20%	-	20%	20%	20%	20%
N100	-	-	40%	20%	20%	20%

Bei Betrachtung der Wachstumsergebnisse nach einem achtwöchigen Versuchszeitraum wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Algengruppen und der Kontrollgruppe gefunden. Das 100%-*Pavlova*-Futtermittel konnte sogar ein signifikant besseres Wachstum der Fische erzielen, als das Basalfuttermittel (Abb. 57).

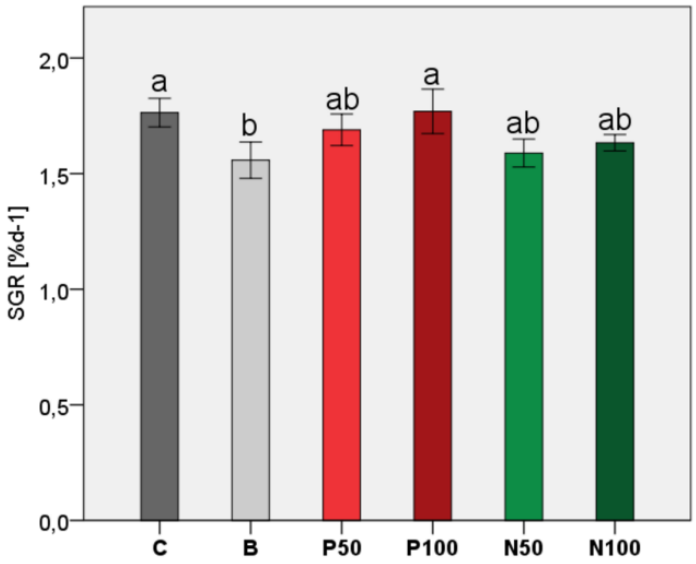

Abb. 57 Spezifische Wachstumsrate der Wolfsbarsche (30 Fische je Gruppe, n=3) in Abhängigkeit der Testfuttermittel (C=Kontrollfuttermittel, B=Basalfuttermittel, P50=50% Fischölaustausch durch *Pavlova*, P100=100% Fischölaustausch durch *Pavlova*, ebenso N50 und N100: Austausch durch *Nannochloropsis*), im Versuchszeitraum von acht Wochen.

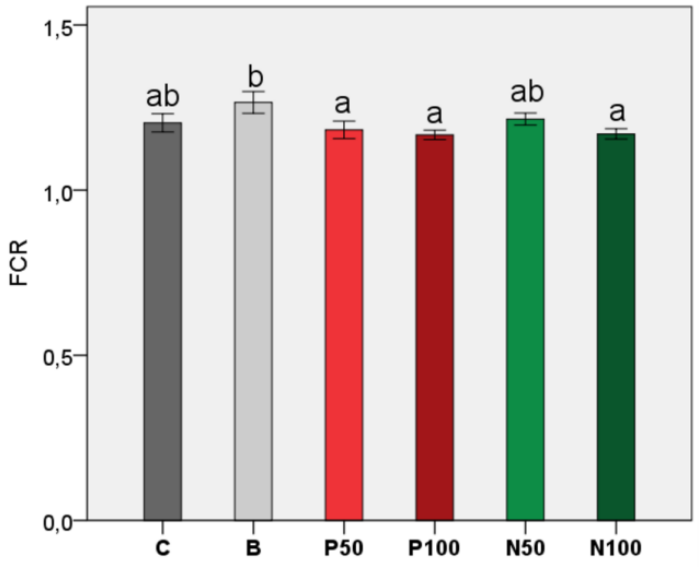

Abb. 58 Futterquotient (aufgenommenes Futter [kg] / Zuwachs [kg]) der Wolfsbarsche (30 Fische je Gruppe, n=3) in Abhängigkeit der Testfuttermittel (C=Kontrollfuttermittel, B=Basalfuttermittel, P50= 50% Fischölaustausch durch *Pavlova*, P100=100% Fischölaustausch durch *Pavlova*, ebenso N50 und N100: Austausch durch *Nannochloropsis*), im Versuchszeitraum von acht Wochen

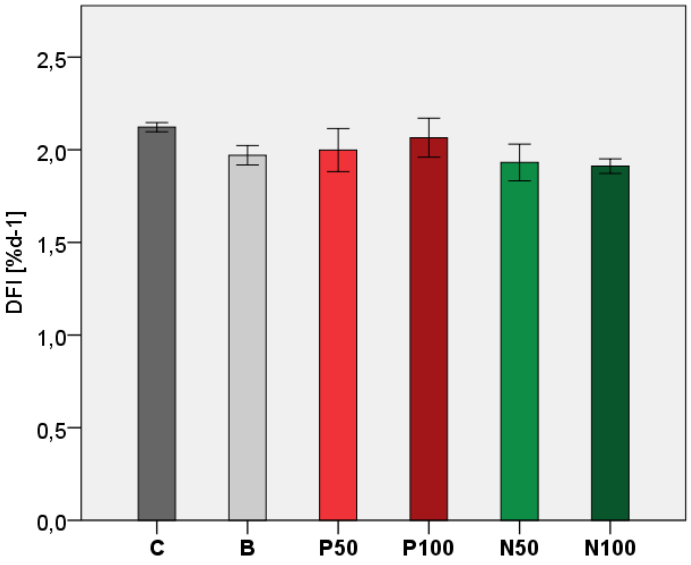

Abb. 59 Tägliche Futteraufnahme der Wolfsbarsche (30 Fische je Gruppe, n=3) in Abhängigkeit der Testfuttermittel (C=Kontrollfuttermittel, B=Basalfuttermittel, P50= 50% Fischölaustausch durch *Pavlova*, P100=100% Fischölaustausch durch *Pavlova*, ebenso N50 und N100: Austausch durch *Nannochloropsis*), im Versuchszeitraum von 8 Wochen

Der positive Wachstumsverlauf der Wolfsbarschgruppen, die die Algenfuttermittel erhalten hatten, ist vermutlich auf das geeignete Fettsäuremuster der Algenprodukte, vor allem von *Pavlova*, zurückzuführen (Abb. 57). Ebenso wurden keine signifikanten Unterschiede des Futterquotienten zwischen den Algengruppen und der Kontrollgruppe nachgewiesen (Abb. 58). Somit kann die Verwertbarkeit der *Pavlova*-Mikroalge als positiv eingestuft werden. Die tägliche Futteraufnahme aller Testgruppen war nicht signifikant unterschiedlich, sodass kein Hinweis auf negative

Geschmacksbeeinträchtigung durch die Stoffe der Algenprodukte gegeben ist (Abb. 59). Im Gegenteil war die Futteraufnahme der 100%-*Pavlova*-Gruppe sogar leicht erhöht.
Die Algenprodukte, vor allem *Pavlova*, scheinen also sehr gut als Fischölersatz geeignet zu sein.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Mikroalge *Pavlova* durchaus positive Ergebnisse in allen getesteten Anwendungsbereichen liefern konnte. Eine erfolgreiche und kostengünstige Produktion von *Pavlova* könnte einen Mehrwert für die marine Fischproduktion darstellen und gleichzeitig zu einer Entlastung ökologischer Ressourcen

8 Produktentwicklung

Die Produktentwicklung wurde aufgrund der Kultivierungsexperimente mit den beiden aussichtsreichsten *Pavlova*-Arten (*Pavlova viridis* und *Pavlova* 1228) durchgeführt.

Dabei wurde die Lagerfähigkeit von gekühlten Konzentraten, das Einfrieren von Konzentraten und das Trocknen der Algenbiomasse untersucht.

Pavlova viridis zeigte als Konzentrat eine Haltbarkeit (bezogen auf das mikroskopische Erscheinungsbild der Zellen) von bis zu zwei Monaten.

Pavlova 1228 dagegen zeigte bereits nach sieben Tagen Auflösungserscheinungen der Zellen.

Pavlova viridis ist damit potentiell geeignet um in konzentrierter Form als Produkt in der Aquakultur eingesetzt zu werden.

Bei *Pavlova* 1228 konnte bisher keine bessere Haltbarkeit erreicht werden, was den Einsatz als Konzentrat ausschließt.

In Abstimmung mit den Fütterungsversuchen an der GMA wurden daraufhin gefrorene Formulierungen der Algenkonzentrate hergestellt.

Dabei zeigte sich erfreulicherweise, dass sowohl *Pavlova viridis* als auch *Pavlova* 1228 durch das Einfrieren und spätere Auftauen nicht direkt geschädigt werden. Die einzelnen Zellen sind im Mikroskop gut erkennbar und sollten als Futter genutzt werden können.

Die Haltbarkeit des aufgetauten Konzentrates wurde mit sieben Tagen im Kühlschrank bestimmt und macht damit einen Praxiseinsatz möglich.

Da allerdings nach Möglichkeit ein frisches, gekühltes Produkt entwickelt werden soll wurden die weiteren Untersuchungen zu Lagerfähigkeit und Futterversuchen zunächst mit *Pavlova viridis* durchgeführt. Diese Art bietet die Möglichkeit frisches und gefrorenes Konzentrat herzustellen.

Um eine noch bessere Lagerfähigkeit (ohne Notwendigkeit der Kühlung bzw. Frostung) zu ermöglichen wurden von *Pavlova viridis* auch gefriergetrocknete Formulierungen angefertigt. Die

Zellen gehen durch das Verfahren nicht kaputt. Allerdings lösen sich die bei der Trocknung entstehenden Flocken nicht gut in Wasser auf.

Deshalb wurde ein Mühle angeschafft mit der es möglich ist die Algenbiomasse nach der Trocknung auf bis zu 300µm zu vermahlen. Die so vermahlene Biomasse löst sich deutlich besser in Wasser auf und konnte in Futterversuchen bei der GMA eingesetzt werden.

Außerdem können nur nach dem Vermahlen die Algen in Futterformulierungen als Trockenfutter für adulte Fische eingearbeitet werden.

Das konnte erfolgreich in den Versuchen der GMA gezeigt werden.

Nach dem Trocknen und Vermahlen der Algen ergibt sich allerdings die Problematik, dass aufgrund der großen Oberfläche des Produktes die wertvollen Fettsäuren durch Kontakt mit Luft oxidiert werden. Um diese Qualitätsminderung des Endproduktes zu vermeiden wurden Versuche mit einem Vakuumschweißgerät durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Algen sich so sehr gut verpacken und lagern lassen.

9 Diskussion

Generell wurden die wesentlichen Ziele des Projektes erreicht.

1.) Erfolgreiche Kultivierung der *Pavlova* Algen im Gewächshaus im produktionsrelevanten Maßstab

2.) Schonende Ernte der Zellen mit der Möglichkeit hochwertiges Larvenfutter herzustellen

3.) Erfolgreiche Produktion von lagerfähigen Produkten in frischen, gefrorenen und getrockneten Formulierungen

4.) erfolgreicher Einsatz der *Pavlova* Algen für die Larvenaufzucht

5.) Erfolgreicher Einsatz der *Pavlova* Algen für die Fütterung adulter Fische

Die Zusammenarbeit innerhalb des Kooperationsprojektes funktionierte effizient und unproblematisch. Dies ist vor allem durch die enge räumliche Nähe der beteiligten Projektpartner bedingt.

Da die Alge *Pavlova* alle erwarteten Eigenschaften aufweist, wird diese Alge zukünftig die Produktpalette der BlueBioTech GmbH erweitern. Erste Muster wurden bereits an Kunden im Aquakulturbereich verschickt. Die Ergebnisse der ersten Fütterungtests bei Kunden sind sehr positiv.

10 Öffentlichkeitsarbeit

Es sind wissenschaftliche Veröffentlichungen seitens des FTZ und der GMA in Vorbereitung

BlueBioTech verwendet die Projektergebnisse zu Marketingzwecken bei der Markteinführung der Alge *Pavlova*.

Anderen Wissenschaftlern werden die Ergebnisse in Form von Fachartikeln und Vorträgen präsentiert.

BlueBioTech schickt die positiven Ergebnisse der Fütterungstests aus dem Projekt direkt an Kunden. Begleitend dazu werden den Kunden Muster der neuen Produkte für eigene Tests angeboten.

11 Fazit

Die Vorgehensweise zur Bearbeitung der Fragestellung hat sich bewährt. Insbesondere das Zusammenspiel und die logische Abfolge von Labor und Technikumsversuchen hat es ermöglicht dieses komplexe Projekt mit seinen ambitionierten Zielen erfolgreich zu bearbeiten

Aufgrund der großen fachlichen Vorerfahrung der Projektpartner konnten die zu Beginn des Projektes formulierten Ziele während des Projektes weitgehend beibehalten werden.