

## **Abschlussbericht Phase I**

### **Effiziente Ressourcenverwertung in Abwässern der Abfallwirtschaft mittels Algenkulturen – ERA<sup>3</sup>**

des Konsortiums  
der **TH Köln**, AG Prof. Rehorek  
und  
der **JLU Gießen**, AG Prof. Gäth

Gefördert durch:

**Ministerium für Umwelt, Landwirtschaft,  
Natur- und Verbraucherschutz  
des Landes Nordrhein-Westfalen**



# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	1
Abbildungsverzeichnis .....	2
Tabellenverzeichnis .....	4
Formelverzeichnis .....	5
Abkürzungen und Definitionen .....	6
Zusammenfassung des vorliegenden Projektes .....	7
Zielstellungen ERA <sup>3</sup> Phase I .....	8
Hintergrund der Studie.....	9
Ergebnisse der Arbeitspakete.....	11
1. Arbeitspaket - Isolierung und Charakterisierung von Mikroalgen aus Deponiesickerwasser.....	12
1.1. Isolierung und Kultivierung der standortangepassten Mikroalgen.....	12
1.2. Mikroskopische Charakterisierung.....	13
1.3. Physiologische Charakterisierung.....	14
1.4. Chemische Taxonomie .....	15
1.5. Kultivierung der Algen in verschiedenen Deponiesickerwässern .....	17
2. Arbeitspaket - Parametererfassung für optimale Kultivierungs-techniken .....	21
2.1. Parameterabhängige Wachstumsraten .....	21
2.2. Abbauraten von Abwasserinhaltsstoffen durch Mikroalgen .....	27
2.3. Biomassebildung unter variierenden Kultivierungsbedingungen (CO <sub>2</sub> -Versuche) .....	39
2.4. Diskussion.....	47
Arbeitspaket 3 – Zwischenbericht.....	61
Arbeitspaket 4 – Vorplanung der halbtechnischen Pilotanlage.....	61
Arbeitspaket 6.1 – Wissenstransfer .....	70
Fazit und Ausblick.....	71
Anhang .....	73
Material und Methoden .....	73
Materialien .....	73
Instrumente und Laborequipment.....	73
Software, Datenbanken und verwendete Programme .....	74
Statistische Analysen .....	74
Organismen .....	74
Kulturmedien.....	74
Methoden.....	78
Analytische Methoden .....	78
Versuchsaufbau der Arbeitspakete .....	84
AP. 1.1 (Universität Gießen) .....	84
AP 1.2 (Universität Gießen) .....	85
AP 1.3 (Universität Gießen) .....	85
AP 1.4 (Universität Gießen) .....	85

AP. 1.5 (TH-Köln) .....	85
AP 2.1 (Universität Gießen) .....	90
AP 2.2 (TH-Köln) .....	90
AP 2.3 (TH-Köln) .....	90
Quellenverzeichnis .....	97

## Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER VERSUCHSANSÄTZE.....	13
ABBILDUNG 2: MIKROSKOPISCHE BILDER DER ALGENSPEZIES DER AUSGEWÄHLTEN DEPONIEEN .....	14
ABBILDUNG 3: VERGLEICH DER SEQUENZEN EINER DER GEFUNDENEN ALGENSPEZIES IM STANDORTANGEPASSTEN MIKROALGEN- BAKTERIEN-KONSORTIUM DER DEPONIE LEPPE UND EINES REFERENZGENOMS VON <i>CHLORELLA SP.</i> DER SAG-GÖTTINGEN (AUSZUG) .....	16
ABBILDUNG 4: WACHSTUMSKURVEN DER MIKROALGEN IN VERSCHIEDENEN SICKERWÄSSERN; IC: INOKULIERTE KULTUREN; CC: KONTROLLKULTUREN (OHNE INOKULATION).....	17
ABBILDUNG 5: VERLÄUFE VON WACHSTUMSRATEN (RECHTE Y-ACHSE, GRÜNE BALKEN)) UND BIOMASSEKONZENTRATIONEN (LINKE Y- ACHSE, ROTE LINIE) EINER ALGENKULTUR IM SICKERWASSER DER DEPONIE LEPPE VOM ENTNAHMEPUNKT „DA4/5“ ÜBER DEN 20-TÄGIGEN VERSUCHSZEITRAUM .....	19
ABBILDUNG 6: VERLÄUFE VON WACHSTUMSRATEN (RECHTE Y-ACHSE, GRÜNE BALKEN)) UND BIOMASSEKONZENTRATIONEN (LINKE Y- ACHSE, ROTE LINIE) EINER ALGENKULTUR IM SICKERWASSER DER DEPONIE LEPPE VOM ENTNAHMEPUNKT „RESERVOIR 1“ ÜBER DEN 20-TÄGIGEN VERSUCHSZEITRAUM.....	20
ABBILDUNG 7: PHOTOMETRISCH GEMESSENE ABSORPTIONSWERTE (ABS) IM ZEITRAUM VON 18 TAGEN BEI 688 NM BEI 18 °C, EINFACHER BELEUCHTUNG UND IN VERSCHIEDENEN DEPONIESICKERWASSERMEDIEN .....	22
ABBILDUNG 8: PHOTOMETRISCH GEMESSENE ABSORPTIONSWERTE (ABS) IM ZEITRAUM VON 25 TAGEN BEI 688 NM BEI 25 °C, EINFACHER BELEUCHTUNG UND IN VERSCHIEDENEN DEPONIESICKERWASSERMEDIEN .....	23
ABBILDUNG 9: PHOTOMETRISCH GEMESSENE ABSORPTIONSWERTE (ABS) IM ZEITRAUM VON 14 TAGEN BEI 688 NM, 30 °C, EINFACHER BELEUCHTUNG UND VERSCHIEDENEN DEPONIESICKERWASSERMEDIEN .....	24
ABBILDUNG 10: PHOTOMETRISCH GEMESSENE ABSORPTIONSWERTE (ABS) IM ZEITRAUM VON 18 TAGEN BEI 688 NM, BEI 18 °C, DOPPELTER BELEUCHTUNG UND MIT VERSCHIEDENEN DEPONIESICKERWASSERMEDIEN.....	25
ABBILDUNG 11: PHOTOMETRISCH GEMESSENE ABSORPTIONSWERTE (ABS) IM ZEITRAUM VON 18 TAGEN BEI 688 NM, BEI 25 °C, DOPPELTER BELEUCHTUNG UND MIT VERSCHIEDENEN DEPONIESICKERWASSERMEDIEN.....	25
ABBILDUNG 12: PHOTOMETRISCH GEMESSENE ABSORPTIONSWERTE (ABS) IM ZEITRAUM VON 14 TAGEN BEI 688 NM, 30 °C, DOPPELTER BELEUCHTUNG UND MIT VERSCHIEDENEN DEPONIESICKERWASSERMEDIEN.....	26
ABBILDUNG 13: PHOTOMETRISCH GEMESSENE ABSORPTIONSWERTE (ABS) IM DEPONIESICKERWASSER VON :METABOLON BEI VERSCHIEDENEN PH-WERTEN, IM ZEITRAUM VON 13 TAGEN BEI 688 NM, BEI 30 °C UND DOPPELTER BELEUCHTUNG.....	27
ABBILDUNG 14: AMMONIUM-STICKSTOFFKONZENTRATIONEN WÄHREND DES 15-TÄGIGEN VERSUCHSZEITRAUMS IN DEN JEWELIGEN SICKERWÄSSERN; IC: INOKULIERTE KULTUREN; CC: KONTROLLKULTUREN (NICHT-INOKULIERTE KULTUREN).....	28
ABBILDUNG 15: NITRIT-STICKSTOFFKONZENTRATIONEN WÄHREND DES 15-TÄGIGEN VERSUCHSZEITRAUMS IN DEN JEWELIGEN SICKERWÄSSERN; IC: INOKULIERTE KULTUREN; CC: KONTROLLKULTUREN (NICHT-INOKULIERTE KULTUREN).....	29
ABBILDUNG 16: NITRAT-STICKSTOFFKONZENTRATIONEN WÄHREND DES 15-TÄGIGEN VERSUCHSZEITRAUMS IN DEN JEWELIGEN SICKERWÄSSERN; IC: INOKULIERTE KULTUREN; CC: KONTROLLKULTUREN (NICHT-INOKULIERTE KULTUREN).....	30
ABBILDUNG 17: ORTHO-PHOSPHAT-PHOSPHOR KONZENTRATIONEN WÄHREND DES 15-TÄGIGEN VERSUCHSZEITRAUMS IN DEN JEWELIGEN SICKERWÄSSERN; IC: INOKULIERTE KULTUREN; CC: KONTROLLKULTUREN (NICHT-INOKULIERTE KULTUREN).....	31
ABBILDUNG 18: CSB-WERTE WÄHREND DES 15-TÄGIGEN VERSUCHSZEITRAUMS IN DEN JEWELIGEN SICKERWÄSSERN; IC: INOKULIERTE KULTUREN; CC: KONTROLLKULTUREN (NICHT-INOKULIERTE KULTUREN).....	32
ABBILDUNG 19: ERGEBNISSE DER WASSERANALYSEN DER VERSUCHSANSÄTZE DES SICKERWASSERS METABOLON BEI 18 °C MIT EINFACHER UND DOPPELTER BELEUCHTUNG .....	33

ABBILDUNG 20: ERGEBNISSE DER WASSERANALYSEN DER VERSUCHSANSÄTZE DES SICKERWASSERS METABOLON BEI 25 °C MIT EINFACHER UND DOPPELTER BELEUCHTUNG .....	34
ABBILDUNG 21: ERGEBNISSE DER WASSERANALYSEN DER VERSUCHSANSÄTZE DES SICKERWASSERS METABOLON BEI 30 °C MIT EINFACHER UND DOPPELTER BELEUCHTUNG .....	34
ABBILDUNG 22: ANALYSE VERSCHIEDENER WASSERPARAMETER DER VERSUCHSANSÄTZE DER SICKERWASSER REISKIRCHEN BEI 18 °C MIT EINFACHER UND DOPPELTER BELEUCHTUNG .....	35
ABBILDUNG 23: ANALYSE VERSCHIEDENER WASSERPARAMETER DER VERSUCHSANSÄTZE DER SICKERWASSER REISKIRCHEN BEI 25 °C MIT EINFACHER UND DOPPELTER BELEUCHTUNG .....	35
ABBILDUNG 24: ANALYSE VERSCHIEDENER WASSERPARAMETER DER VERSUCHSANSÄTZE DER SICKERWASSER REISKIRCHEN BEI 30 °C MIT EINFACHER UND DOPPELTER BELEUCHTUNG .....	36
ABBILDUNG 25: ANALYSE VERSCHIEDENER WASSERPARAMETER DER VERSUCHSANSÄTZE DER SICKERWASSER AßLAR BEI 18 °C MIT EINFACHER UND DOPPELTER BELEUCHTUNG .....	36
ABBILDUNG 26: ANALYSE VERSCHIEDENER WASSERPARAMETER DER VERSUCHSANSÄTZE DER SICKERWASSER AßLAR BEI 25 °C MIT EINFACHER UND DOPPELTER BELEUCHTUNG .....	37
ABBILDUNG 27: ANALYSE VERSCHIEDENER WASSERPARAMETER DER VERSUCHSANSÄTZE DER SICKERWASSER AßLAR BEI 30 °C MIT EINFACHER UND DOPPELTER BELEUCHTUNG .....	38
ABBILDUNG 28: WACHSTUMSVERLAUF IM BATCH-EXPERIMENT .....	40
ABBILDUNG 29: ALGENWACHSTUMSVERLAUF UND KONZENTRATIONEN ABWASSERRELEVANTER INHALTSSTOFFE IM FED-BATCH-RACEWAY-EXPERIMENT .....	41
ABBILDUNG 30: VERLAUF DER AMMONIUMKONZENTRATIONEN WÄHREND DER BIOFILM-BASIERTEN KULTIVIERUNG (VORVERSUCH IM 17 L MAßSTAB) .....	42
ABBILDUNG 31: BIOMASSEERTRÄGE MIT STANDARDABWEICHUNG NACH 15-TÄGIGER KULTIVIERUNG IN DEN KONTROLLGRUPPEN: A) INOKULIERTE KULTUR; B) KONTROLLE 1: NICHT INOKULIERTE KULTUR; C) KONTROLLE 2: NICHT INOKULIERTE, ABGEDUNKELTE KULTUR .....	43
ABBILDUNG 32: BIOFILME BEI 400-FACHER VERGRÖßERUNG NACH 15-TÄGIGER KULTIVIERUNG IN DEN KONTROLLGRUPPEN: A) INOKULIERTE KULTUR; B) KONTROLLE 1: NICHT INOKULIERTE KULTUR; C) KONTROLLE 2: NICHT INOKULIERTE, ABGEDUNKELTE KULTUR .....	44
ABBILDUNG 33: KONZENTRATIONSVERLAUF VERSCHIEDENER ABWASSERRELEVANTER INHALTSSTOFFE WÄHREND DES 15-TÄGIGEN KULTIVIERUNGSVERLAUFS IM VERSUCH „BIOFILM-BASIERTE KULTIVIERUNG (VERSUCH IM IBC - MAßSTAB)“ IN DEN KONTROLLGRUPPEN: A) INOKULIERTE KULTUR; B) KONTROLLE 1: NICHT INOKULIERTE KULTUR; C) KONTROLLE 2: NICHT INOKULIERTE, ABGEDUNKELTE KULTUR.....	46
ABBILDUNG 34: KORRELATION ZWISCHEN DER WACHSTUMSDYNAMIK UND DER ORTHO-PHOSPHAT-PHOSPHOR KONZENTRATION IN ALLEN INNOKULIERTEN KULTUREN.....	49
ABBILDUNG 35: MASSENILANZ DER AMMONIUM-STICKSTOFF-ABNAHME (ORANGE BALKEN) UND DER NITRIT/NITRAT-STICKSTOFF ZUNAHME (BLAUE BALKEN) ZWISCHEN TAG 1 UND 15 DES 15-TÄGIGEN KULTIVIERUNGSZEITRAUMS. ....	56
ABBILDUNG 36: „PHYTOBOX“ – SYSTEM DER FIRMA PHYTOLINC (QUELLE: PHYTOLINC UG) .....	64
ABBILDUNG 37: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER PATENTIERTEN „TWIN-LAYER-MEMBRAN“ (SHI, PODOLA AND MELKONIAN, 2007) .....	65
ABBILDUNG 38: LAGEPLAN DER DEPONIE LEPPE IN LINDLAR MIT DEPONIEABSCHNITTEN ((STEINER, 2019) .....	76
ABBILDUNG 39: LAGEPLAN DER DEPONIE IN AßLAR MIT SICKERWASSERENTNAHMESTELLEN (LANDSCHAFT, 2010) .....	77
ABBILDUNG 40: DIE DEPONIE REISKIRCHEN UND IHRE VERSCHIEDENEN SEGMENTE AUS DER VOGELPERSPEKTIVE (ZORBACH, 2014) .....	78
ABBILDUNG 41: VERSUCHSAUFBAU FÜR VORVERSUCHE UND VORKULTIVIERUNG DER ISOLIERTEN, STANDORTANGEPASSTEN MIKROALGEN .....	79
ABBILDUNG 42: IMPROVED-NEUBAUER ZÄHLKAMMER (SOURCE: VWR INTERNATIONAL, 2019).....	80
ABBILDUNG 43: WACHSTUMSKURVE EINER MIKROALGENKULTUR ALS MESSUNG DER OPTISCHEN DICHTEN BEI 680 NM, AUFGETRAGEN GEGEN DIE KULTIVIERUNGSZEIT. ....	81
ABBILDUNG 44: STANDARDKURVE ALS EXTINKTION BEI 680NM, AUFGETRAGEN GEGEN DIE ZELLZAHL EINER MIKROALGENKULTUR, KULTIVIERT IN DEPONIESICKERWASSER DER DEPONIE LEPPE (RESERVOIR 1) .....	81

ABBILDUNG 45: STANDARDKURVE ALS EXTINKTION BEI 680 NM, AUFGETRAGEN GEGEN DIE BIOMASSEKONZENTRATION UND DIE KONZENTRATION (TS) FLÜCHTIGER ORGANISCHER BESTANDTEILE (VS) EINER MIKROALGENKULTUR, KULTIVIERT IN DEPONIESICKERWASSER DER DEPONIE LEPPE (RESERVOIR 1).....	82
ABBILDUNG 46: REGRESSION ZWISCHEN DEN GEMESSENEN EXTINKTIONSWERTEN UND DEN BIOMASSEKONZENTRATIONEN IN DEN VERSUCHSREIHEN FÜR TEMPERATUR, LICHT UND PH-WERT; ARBEITSPAKET 2.1.....	82
ABBILDUNG 47: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER VERSUCHSANSÄTZE.....	85
ABBILDUNG 48: SCHEMATISCHE ZEICHNUNG EINER ERLIENMEYERKOLLBEN-LABORKULTUR MIT BEGASUNG.....	87
ABBILDUNG 49: SPEKTRUM UND EIGENSCHAFTEN DER EINGESETZTEN LED-LEUCHTEN (WWW.B2B.BIOLEDX.DE/BIOLEDX-ASTIR-LED-PFLANZENLEUCHE.HTML, 2019).....	87
ABBILDUNG 50: VERSUCHSAUFBAU DER LABORKULTUREN.....	88
ABBILDUNG 51: LICHTVERTEILUNG IM LABORABZUG ALS AUFSICHT ÜBER DER ABZUGSFLÄCHE.....	88
ABBILDUNG 52: ENDGÜLTIGER VERSUCHSAUFBAU DER LABORKULTUREN.....	88
ABBILDUNG 53: DRAUFSICHT AUF DEN RANDOMISIERTEN VERSUCHSAUFBAUS VON EXPERIMENT 1. A: „RESERVOIR 1“ INOKULIERT; B: „DA 4/5“ INOKULIERT; C: KONTROLLKULTUR „RESERVOIR 1“ (OHNE INOKULATION); D: KONTROLLKULTUR „DA 4/5“ (OHNE INOKULATION).....	89
ABBILDUNG 54: DRAUFSICHT AUF DEN RANDOMISIERTEN VERSUCHSAUFBAUS VON EXPERIMENT 2. A: „AßLAR“ INOKULIERT; B: „REISKIRCHEN“ INOKULIERT; C: KONTROLLKULTUR „AßLAR“ (OHNE INOKULATION); D: KONTROLLKULTUR „REISKIRCHEN“ (OHNE INOKULATION).....	89
ABBILDUNG 55: LICHTINTENSITÄTEN UND BELEUCHTUNGSFLÄCHEN BEI UNTERSCHIEDLICHEN WASSERSTÄNDEN DES KULTIVIERUNGSMEDIUMS IM IBC-VERSUCH.....	92
ABBILDUNG 56: A) BEGASUNG, PUMPE UND BELEUCHTUNG IM IBC-VERSUCH; B) GRUNDLEGENDER VERSUCHSAUFBAU DER IBC-SUSPENSIONSKULTUREN (VERSUCH 3).....	92
ABBILDUNG 57: VERSUCHSAUFBAU IM FED-BATCH-RACEWAY-VERSUCH.....	93
ABBILDUNG 58: SCHWIMMENDE MEMBRANKULTUR MIT ALGININOKULUM AN TAG 1 DER KULTIVIERUNG.....	94
ABBILDUNG 59: MEMBRANKULTUREN IM VERSUCH „BIOFILM-BASIERTE KULTIVIERUNG (VERSUCH IM IBC-MAßSTAB)“; LINKS: MEMBRAN MIT SCHLAUCH-AUFTRIEBSKÖRPER; RECHTS: ANORDNUNG DER MEMBRANEN AUF DER WASSEROBERFLÄCHE IM IBC.....	95
ABBILDUNG 60: GENERELLER VERSUCHSAUFBAU „BIOFILM-BASIERTE KULTIVIERUNG (VERSUCH IM IBC-MAßSTAB)“.....	95

## Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: AUFLISTUNG DER MEILENSTEINE FÜR DIE EINZELNEN ARBEITSPAKETE IN PROJEKTPHASE I.....	8
TABELLE 2: ÜBERSICHT DER FÜR ERA <sup>3</sup> AUSGEWÄHLTEN DEPONIEEN.....	12
TABELLE 3: PROBENORT UND VORGEFUNDENE ALGENSPEZIES IN VERSCHIEDENEN DEPONIESICKERWÄSSERN DER UNTERSUCHTEN DKII-DEPONIEEN.....	13
TABELLE 4: MAXIMALE, MITTLERE- UND AKKUMULIERTE WACHSTUMSRATEN DER INOKULIERTEN KULTUREN INNERHALB DES 15-TÄGIGEN KULTIVIERUNGSZEITRAUMS.....	18
TABELLE 5: ZUSAMMENFASSENDE ÜBERSICHT ZU DEN ABSORPTIONSMAXIMA DER UNTERSCHIEDLICHEN SICKERWÄSSER BEI UNTERSCHIEDLICHEN TEMPERATUREN UND EINFACHER BELEUCHTUNGSINTENSITÄT.....	24
TABELLE 6: ZUSAMMENFASSENDE ÜBERSICHT DER ABSORPTIONSMAXIMA DER UNTERSCHIEDLICHEN DEPONIESICKERWÄSSER BEI TEMPERATUREN VON 18°C-30°C UND DOPPELTER BELEUCHTUNGSINTENSITÄT.....	26
TABELLE 7: T-TEST UND U-TEST (MANN-WHITNEY-TEST) DER UNTERSCHIEDE ZWISCHEN INOKULIERTEN KULTUREN (IC) UND KONTROLLKULTUREN (CC). MITTELWERTE DER AMMONIUM-SICKSTOFFKONZENTRATIONEN MIT STANDARDABWEICHUNGEN ALLER GETESTETER SICKERWÄSSER; STATISTISCHE SIGNIFIKANZ IST DURCH UNTERSCHIEDLICHE, HOCHGESTELLTE BUCHSTABEN ANGEZEIGT.....	28
TABELLE 8: T-TEST UND U-TEST (MANN-WHITNEY-TEST) AUF UNTERSCHIEDE ZWISCHEN INOKULIERTEN KULTUREN (IC) UND KONTROLLKULTUREN (CC). MITTELWERTE DER NITRIT-SICKSTOFFKONZENTRATIONEN MIT STANDARDABWEICHUNGEN ALLER	

GETESTETEN SICKERWÄSSER; STATISTISCHE SIGNIFIKANZ IST DURCH UNTERSCHIEDLICHE, HOCHGESTELLTE BUCHSTABEN ANGEZEIGT.....	29
TABELLE 9: T-TEST UND U-TEST (MANN-WHITNEY-TEST) AUF UNTERSCHIEDE ZWISCHEN DEN INOKULIERTEN KULTUREN (IC) UND DEN KONTROLLKULTUREN (CC). MITTELWERTE DER NITRAT-SICKSTOFFKONZENTRATIONEN MIT STANDARDABWEICHUNGEN ALLER GETESTETEN SICKERWÄSSER; STATISTISCHE SIGNIFIKANZ IST DURCH UNTERSCHIEDLICHE, HOCHGESTELLTE BUCHSTABEN ANGEZEIGT.....	30
TABELLE 10: T-TEST UND U-TEST (MANN-WHITNEY-TEST) AUF UNTERSCHIEDE ZWISCHEN INOKULIERTEN KULTUREN (IC) UND KONTROLLKULTUREN (CC). MITTELWERTE DER ORTHO-PHOSPHAT-PHOSPHOR KONZENTRATIONEN MIT STANDARDABWEICHUNGEN ALLER GETESTETEN SICKERWÄSSER; STATISTISCHE SIGNIFIKANZ IST DURCH UNTERSCHIEDLICHE, HOCHGESTELLTE BUCHSTABEN ANGEZEIGT.....	31
TABELLE 11: T-TEST UND U-TEST (MANN-WHITNEY-TEST) AUF UNTERSCHIEDE ZWISCHEN INOKULIERTEN KULTUREN (IC) UND KONTROLLKULTUREN (CC). MITTELWERTE DER AMMONIUM-SICKSTOFFKONZENTRATIONEN MIT STANDARDABWEICHUNGEN ALLER GETESTETEN SICKERWÄSSER; STATISTISCHE SIGNIFIKANZ IST DURCH UNTERSCHIEDLICHE, HOCHGESTELLTE BUCHSTABEN ANGEZEIGT.....	32
TABELLE 12: VERGLEICH WICHTIGER WACHSTUMSRATEN UND PARAMETER IN DEN VERSCHIEDENEN SICKERWÄSSERN VON ERA <sup>3</sup> PHASE I INKL. EINES VERGLEICHS MIT ÄHNLICHEN STUDIEN. G(MAX): MAXIMALE WACHSTUMSRATE INNERHALB DES VERSUCHSZEITRAUMS; G(MED): DURCHSCHNITTLICHE WACHSTUMSRATE INNERHALB DES VERSUCHSZEITRAUMES; BM(MAX): MAXIMALE BIOMASSEPRODUKTION WÄHREND DES KULTIVIERUNGSZEITRAUMES; C(x): KONZENTRATION DER SUBSTANZ X IM DEPONIESICKERWASSER.....	51
TABELLE 13: VOR- UND NACHTEILE VON BIOFILM- UND SUSPENSIONSBASIERTER KULTIVIERUNG.....	60
TABELLE 14: LISTE DER VERWENDETEN INSTRUMENTE.....	73
TABELLE 15: LISTE DER ANGEWENDETEN SOFTWARE.....	74
TABELLE 16 RELEVANTE WASSERPARAMETER DER VERWENDETEN DEPONIESICKERWÄSSER.....	75
TABELLE 17: VERWENDETE KÜVETTEN-TESTS (HACH-LANGE, 2019).....	83
TABELLE 18: GRUNDLEGENDE KULTIVIERUNGSBEDINGUNGEN DER LABORKULTUREN.....	86

## Formelverzeichnis

FORMEL 1: BERECHNUNG DES AMMONIAKANTEILS AN DER TAN-GESAMTKONZENTRATION (CLAUDE E. BOYD, 1998; KÖRNER <i>ET AL.</i> , 2001).....	55
FORMEL 2: EXTRAPOLATION DER GESAMTZELLZAHL DURCH MESSUNG MIT EINER NEUBAUER ZELLZÄHLKAMMER IN EINEM DEFINIERTEN VOLUMEN.....	80

## Abkürzungen und Definitionen

AU	Absorption Units
AP	Arbeitspaket
AOX	Adsorbierbare Organisch gebundene Halogene
BAV	Bergischer Abfallwirtschaftsverband
BMP	Biochemisches Methanpotential
CC	Kontrollkultur (nicht mit dem Mikroalgen-Bakterien-Konsortium angeimpfte) Kultur
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf
GC	Gaschromatographie
HRAP	High rate algal pond
IC	Inokulierte (mit dem Mikroalgen-Bakterien-Konsortium angeimpfte) Kultur
$\text{NH}_4^+$	Ammonium
$\text{NH}_4^+\text{-N}$	Ammonium-Stickstoff
$\text{NH}_3$	Ammoniak
$\text{NO}_2^-\text{-N}$	Nitrit-Stickstoff
$\text{NO}_2^-$	Nitrit
$\text{NO}_3^-\text{-N}$	Nitrat-Stickstoff
$\text{NO}_3^-$	Nitrat
PBR	Photobioreactor
$\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$	Phosphat-Phosphor (Orthophosphat-phosphorous)
$\text{PO}_4^{3-}$	Phosphat (Orthophosphat)
VS	Volatile solids
TS	Total solids
TAN	Total ammonia nitrogen (Gesamtmenge an Ammonium und Ammoniak)
TOC	Total Organic Carbon
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/w)	Gewichtsprozent

## Zusammenfassung des vorliegenden Projektes

Die großtechnische Verwendung von Mikroalgen zur Aufbereitung von Deponiesickerwässern scheiterte bisher in erster Linie an dessen hohen Belastungen mit TAN und Trübstoffen. Bisher konnte kein System entwickelt werden, welches ohne Verdünnung in unterschiedlichen, ähnlich mit TAN und CSB belasteten Deponiesickerwässern einsetzbar ist.

In Vorarbeiten des Projektes ERA<sup>3</sup> konnte eine natürlich vorkommende Algenkultur in den stark mit Ammonium und Trübstoffen belasteten Sickerwässern der Deponie Leppe identifiziert und angereichert werden. In der vorliegenden Phase I des Projektes ERA<sup>3</sup> sollte überprüft werden, ob und unter welchen Bedingungen es möglich ist, dieses standortangepasste Mikroalgen-Bakterien-Konsortium zur Aufbereitung der Abwässer zu nutzen. Dabei wurden vier verschiedene Sickerwässer untersucht, mit der Kultur der Deponie Leppe angeimpft, und das Algenwachstum sowie dessen Auswirkungen auf die Konzentrationen abwasserrelevanter Inhaltsstoffe untersucht.

Die Ergebnisse der AP 1.1 bis 1.4 zeigen, dass die Gattung *Chlorella* als überwiegende Algengattung in den Sickerwässern der Deponie Leppe (unterschiedliche Entnahmepunkte), aber auch in allen anderen untersuchten Sickerwässern der Deponien Reiskirchen und Aßlar, auf natürliche Weise vorkommt.

Unter optimierten Bedingungen war es im AP 1.5 möglich dieses Mikroalgen-Bakterien-Konsortium der Deponie Leppe in allen vier Sickerwässern bei wiederholbar guten Wachstumsraten von bis zu 1,2 g Algenbiomasse pro Liter und Tag zu kultivieren. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Kultivierbarkeit der Algen wesentlich weniger vom Belastungsgrad der Sickerwässer, als vielmehr von der Optimierung der Kultivierungsbedingungen sowie der Verwendung standortadaptierter Mikroalgen-Bakterien-Konsortien abhängig ist. Es konnte eine Toleranz der Algen gegenüber hohen Belastungen mit dem zuvor als wachstumsinhibierenden Stoff Ammonium von bis zu maximal 934 mg/L und hoher Trübung (CSB-Werte von bis zu 2076 mg/L) nachgewiesen werden.

Im AP 2.1 ergaben Untersuchungen zu den Wachstumsraten bei unterschiedlichen Temperaturen, Lichtverhältnissen und pH-Werten, dass *Chlorella sp.* am besten in den untersuchten Sickerwässern wächst, wenn die Kultivierungstemperatur unter 25°C liegt und ein pH-Wert von 9 nicht überschritten wird.

Im Arbeitspaket 2.2 konnte nachgewiesen werden, dass die Inokulation mit dem Mikroalgen-Bakterien-Konsortium der Deponie Leppe zu einer signifikanten Reduktion ( $p < 0,05$ ) der abwasserrelevanten Inhaltsstoffe Nitrit, Nitrat, Phosphat sowie von organischen Verbindungen (CSB) im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ohne Inokulation führt. Der Unterschied hinsichtlich der Ammoniumkonzentrationen war nicht statistisch signifikant ( $p > 0,05$ ).

In AP 2.3 wurden suspensions- und membranbasierte Systeme auf ihr Skalierungspotential hin überprüft. Bei der Skalierung des suspensionsbasierten Systems wurde eine Lichtlimitierung festgestellt. Erst bei starker Durchmischung in einem „Fed-Batch-Raceway“ und bei Verdopplung der Lichtintensität konnten Algenkonzentrationen von maximal etwa 1 g/L erzielt werden. Beim Einsatz des membranbasierten Systems konnte auch ohne die Verdopplung der Lichtintensität und ohne Erhöhung der Durchmischung, Algenwachstum nachgewiesen werden. Dies wird auf die bessere Lichtausbeute der an der Oberfläche schwimmenden Membranen zurückgeführt. Nach der 15-tägigen membranbasierten Kultivierung im 120 L – IBC – Maßstab wurde in den Kulturen mit Algenwachstum eine Reduktion der Ammonium- und ortho-Phosphat Konzentrationen, gegenüber einer abgedunkelten Kontrollgruppe ohne Algenwachstum, nachgewiesen. Der Abbau von Ammonium in den membranbasierten Systemen steht im Widerspruch zum fehlenden Abbau in den suspensionsbasierten Kulturen aus AP 2.2. In den Biofilmen wurden außerdem andere Algengattungen



vorgefunden, die bisher in den suspensionsbasierten Kulturen noch nicht identifiziert werden konnten. *Chlorella sp.* wurde hier nicht mehr als dominante Algengattung vorgefunden.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde im Arbeitspaket 4 eine halbtechnische Pilotanlage geplant. In der zweiten Projektphase soll primär ein biofilmbasiertes, kommerziell erhältliches Mikroalgenkultivierungssystem der Firma Phytolinc als Grundlage der weiteren Forschungsarbeiten am Standort Metabolon etabliert werden. In diesem System wachsen die Algen getrennt vom Wasserkreislauf in Biofilmen auf einer patentierten „Twin-Layer-Membran“. Dieses System ist modular aufgebaut und soll unter zu bestimmenden Voraussetzungen industriell eingesetzt werden. Parallel dazu soll ein Open-Pond-System aufgebaut werden, um die verschiedenen Systeme hinsichtlich ihres Potentials zur Deponiesickerwasseraufbereitung vergleichen zu können.

## Zielstellungen ERA<sup>3</sup> Phase I

Die Projektphase I von ERA<sup>3</sup> besteht aus insgesamt 5 Arbeitspaketen (Tabelle 1) und endet mit der Vorlage des Abschlussberichts und der Vorplanung der halbtechnischen Pilotanlage für die Projektphase II.

Im Arbeitspaket 1 (AP 1) ist es Ziel, vier Deponiesickerwässer auf vorliegende Algenkulturen hin zu untersuchen, zu charakterisieren und zu kultivieren. Das Ziel in Arbeitspaket 2 (AP 2) ist es, die Parameter für optimale Kultivierungsbedingungen von Mikroalgen in unverdünntem Deponiesickerwasser zu finden und die Reinigungsleistung der Mikroalgenkulturen hinsichtlich Ammonium und anderer deponiesickerwasserrelevanter Bestandteile zu optimieren. Im Arbeitspaket 3 (AP 3) wurde ein Zwischenbericht angefertigt und dem LANUV vorgelegt. Vorbereitend für Projektphase II sollen die erzielten Ergebnisse in Arbeitspaket 4 (AP 4) dazu verwendet werden, die Vorplanungen einer halbtechnischen Pilotanlage vorzunehmen. In Arbeitspaket 5 (AP 5) sollen die erzielten Ergebnisse mit der Öffentlichkeit geteilt und diskutiert werden. Die Meilensteine der einzelnen Arbeitspakete sind in Tabelle 1 aufgeführt.

**Tabelle 1: Auflistung der Meilensteine für die einzelnen Arbeitspakete in Projektphase I**

Arbeitspakete Phase I	Anfang	Abschluss	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3
AP 1: Isolierung und Charakterisierung von Algen aus Deponiesickerwasser	01.04.2019	30.09.2019	■	■				
AP2: Parametererfassung für optimale Kultivierungsbedingungen	01.07.19	31.08.2020		■	■	■	■	
AP 3: Zwischenbericht	01.02.2020	30.04.2020				■		
AP 4: Vorplanung halbtechnische Pilotanlage	01.07.2020	31.12.2020						■
AP 5: Wissenstransfer	01.05.2020	31.12.2020 und 2021					■	■

Um den Projekterfolg klar zu definieren wurden im Projektantrag „Kriterien für eine erfolgreiche Projektphase I“ formuliert. Diese wurden wie folgt erreicht:

- Erfolgreiche Anzucht der Kulturen im 10 Liter- bzw. im 1 m<sup>3</sup> - Maßstab und Aufrechterhaltung eines konstanten Algenwachstums bzw. einer konstanten Biomasseproduktion im Bereich der exponentiellen und der stationären Phase über mindestens 2 Wochen (ohne Ernte) und 4 Wochen (inkl. Ernte).
- Dreifache Wiederholung eines Experimentes mit einer Wachstumsrate von mindestens 0,6 - 0,9 g TM\*l<sup>-1</sup>\*d<sup>-1</sup>.
- Kultivierung der Algen in mindestens drei unterschiedlichen Deponiesickerwässern im Labormaßstab.
- Absprache, Abgrenzung und wissenschaftlicher Diskurs zu den Ergebnissen aus dem DBU geförderten Projekt in der Pohlschen Heide.

Diese Kriterien konnten vollständig erreicht werden. Die Ergebnisse sind im vorliegenden Bericht dargelegt.

## Hintergrund der Studie

In NRW fallen jährlich ca. 6 Mio. m<sup>3</sup> Deponiesickerwasser mit einem hohen Anteil an bioverfügbaren Stickstoff- und Phosphorverbindungen an (LANUV, 2002; Tiedt, 2015). Durch die Reglementierungen der deutschen Abwasserverordnung ergibt sich ein hoher Energiebedarf zur Einhaltung der Einleitungskriterien in kommunale Kläranlagen (indirekte Einleitung) oder Oberflächengewässer (direkte Einleitung) (Heyer and Stegmann, 2005; AbwV, 2016). Daher ist es sinnvoll, nachhaltige Methoden zur Abwasserbeseitigung zu entwickeln, die zur Ressourcen- und Energieeffizienz des Behandlungsprozesses auf Deponie- und Entsorgungsstandorten beitragen.

Obwohl Deponiesickerwässer aus Deponien mit organischen Ablagerungen große Mengen wertvoller Nährstoffe enthalten, können sie i.d.R. aufgrund der potenziellen Schadstoffbelastung nicht weiterverwendet werden und gehen verloren. Eine potentielle Möglichkeit, die Nährstoffe zurück zu gewinnen, ist die Kultivierung von Mikroalgen in den Abwässern (Edmundson, 2012). Auf diese Weise werden die Nährstoffe in Algenbiomasse umgewandelt, welche sich anschließend verwerten lässt und beispielsweise zur Biogasproduktion genutzt werden kann (Mussgnug, 2010).

In vorangegangenen Studien konnte bereits nachgewiesen werden, dass das Wachstum der Algen in den Sickerwässern zu einer Reduktion abwasserrelevanter Nährstoffe (Stickstoff- und Phosphorverbindungen) sowie organischen Verbindungen führt (Nawaz *et al.*, 2020). Zudem konnten auch Inhaltsstoffe wie Schwermetalle durch die Kultivierung aus den Sickerwässern entfernt werden (Richards and Mullins, 2013). Angetrieben durch die meist photosynthetische Lebensweise, benötigen Algen neben den bereits enthaltenen Nährstoffen in erster Linie Kohlendioxid und Sonnenlicht um Bioenergie in Form von Lipiden und Kohlenwasserstoffen aufzubauen (Liao *et al.*, 2018). Das Kohlendioxid kann zur Ertragssteigerung und pH-Optimierung aus anderen Prozessen, in denen es häufig als politisch brisantes Abfallprodukt anfällt, zugegeben werden. Im Gegensatz zu etablierten biologischen Systemen, können außerdem Ressourcen eingespart werden. So werden beispielsweise bei der Nitrifikation in etablierten biologischen Reinigungsverfahren große Mengen an Sauerstoff und Natronlauge für die Aktivität der heterotrophen Bakterien benötigt (Spekat, Enke and Kreienkamp, 2007; Bharagava and Chowdhary, 2018). Dies ist bei der Verwendung algenbasierter Systeme, welche das Ammonium assimilativ aus den Sickerwässern entfernen können, nicht nötig. Umgekehrt produzieren die Algen Sauerstoff, der von den Bakterien zur Oxidation von Stickstoff benötigt wird. So können die Mikroalgen den Energieeintrag in der gesamten Abwasseraufbereitung senken, indem sie

die Abwässer der Abfallwirtschaft nicht nur als Nährstoffquelle nutzen, sondern beispielsweise auch Energiekosten bei einer anschließenden Belüftung von konventionellen Belebungsstufen sparen.

Das Ausmaß, in dem Mikroalgen zur Behandlung von Abwässern aus der Abfallwirtschaft beitragen können, ist bisher jedoch kaum erforscht. Viele Kultivierungsversuche scheitern an den lebensfeindlichen Bedingungen in den Sickerwässern. Insbesondere die hohe Trübung sowie hohe Ammonium- und Ammoniakkonzentrationen wurden bisher für wachstumshemmende und wachstumsinhibierende Effekte verantwortlich gemacht (Lin *et al.*, 2007; Büscher, Harborth and Thiel, 2013; Pereira *et al.*, 2016). Um diese Effekte zu reduzieren, setzte man bislang insbesondere auf hohe Verdünnungen der Sickerwässer (Lin *et al.*, 2007; Edmundson, 2012; Büscher, Harborth and Thiel, 2013; Cheng and Tian, 2013; Edmundson and Wilkie, 2013; Zhao *et al.*, 2014a; Sforza *et al.*, 2015; Paskuliakova, Tonry and Touzet, 2016; Pereira *et al.*, 2016; Tossavainen *et al.*, 2017; El Ouaer *et al.*, 2017; Nordin, Yusof and Samsudin, 2017). Wobei der Verdünnungsfaktor laut eines kürzlich veröffentlichten Übersichtsartikels von Nawaz *et al.* in der Regel zwischen 10 und 50% liegt (Nawaz *et al.*, 2020). Bei einer großtechnischen Etablierung müssten demnach große Mengen Süßwasser zugegeben werden. Dies scheint vor dem Anspruch einer ökologisch- und ökonomisch effizienten Behandlung, aufgrund der begrenzten Süßwasserverfügbarkeit und den damit verbundenen hohen Kosten, nicht praktikabel. Andere Versuche, die Kultivierbarkeit zu verbessern, wie beispielsweise die Selektion und Verwendung ammoniumtoleranter Mikroalgen oder die Optimierung der Kultivierungsbedingungen, scheiterten häufig daran, dass isolierte Kulturen einzelner Spezies, Mikroalgen-Konsortien oder Mikroalgen-Bakterien-Konsortien in der Regel nicht geeignet waren, in einer Vielzahl verschiedener Sickerwässer zu wachsen (Lin *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2014b; Paskuliakova *et al.*, 2018). Gute Erfahrungen wurden mit biofilm-basierten Systemen und isolierten Algenspezies (*Clorella sp.*) (Zhang and Cheng, 2018; Chang *et al.*, 2019) oder standortangepassten Mikroalgen-Bakterien-Konsortien (Liu *et al.*, 2017) gemacht.

Bisher wurde jedoch noch kein Ansatz gefunden, die toxischen Effekte von Deponiesickerwasser auf Mikroalgen stabil und kontinuierlich zu vermeiden und ein System zu entwickeln, dass in verschiedenen, hochbelasteten Sickerwässern ohne Verdünnung oder Vorbehandlung einsetzbar ist (Zhuang *et al.*, 2018a; Nawaz *et al.*, 2020).

## Ergebnisse der Arbeitspakete

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Arbeitspakete vorgestellt. Der Material und Methoden Teil ist im Anhang ab Seite 73 beschrieben. Eine Diskussion der Ergebnisse schließt sich im Rahmen des Arbeitspaketes 2.4 ab Seite 47 an. Dieses Arbeitspaket wurde im ursprünglichen Projektantrag mit „Analytik“ bezeichnet.

Dem Arbeitsplan entsprechend, wurden die Arbeitspakete 1.1 (Isolierung und Kultivierung der standortangepassten Mikroalgen), 1.2 (Mikroskopische Charakterisierung), 1.3 (Physiologische Charakterisierung), 1.4 (Chemische Taxonomie) sowie 2.1 (Parameterabhängige Wachstumsraten) beim Projektpartner an der Universität Gießen durchgeführt.

Die Arbeitspakete 1.5 (Kultivierung der angepassten Algen in verschiedenen Deponiesickerwässern) und 2.3 (Biomassebildung unter variierenden Kultivierungsbedingungen) wurden an der TH-Köln erarbeitet. AP 2.3 wurde, anders als geplant, nicht an der Universität Gießen, sondern an der TH-Köln durchgeführt. Grund war, dass für die Versuche im Pilotmaßstab größere Mengen an Sickerwasser benötigt wurden. Das auf dem Grundstück der Deponie Leppe arbeitende Forschungsinstitut :metabolon der TH-Köln ermöglicht durch die enge infrastrukturelle Vernetzung mit dem Bergischen Abfallwirtschaftsverband einen direkten Zugang zu dem Sickerwasser. Bei Durchführung an der Universität Gießen wären hierfür aufwendige Transporte nötig gewesen.

Arbeitspaket 2.2 wurde an beiden Standorten durchgeführt. Auch die Arbeitspakete 2.4 (Analytik), 3 (Zwischenbericht), 4 (Vorplanung der halbtechnischen Pilotanlage) und 5. (Wissenstransfer) wurden gemeinsam erarbeitet.

# 1. Arbeitspaket - Isolierung und Charakterisierung von Mikroalgen aus Deponiesickerwasser

Das Arbeitspaket 1 gliedert sich in die 5 untergeordneten Arbeitspakete, 1.1 bis 1.5. Im Arbeitspaket 1.1 fand die Isolierung und Kultivierung der standortangepassten Mikroalgen statt. Die hier kultivierte Mikrobiozönose wurde in den Arbeitspaketen 1.2 bis 1.4 mikroskopisch, physiologisch und biochemisch charakterisiert. Im Arbeitspaket 1.5 wurde das an der Deponie Leppe isolierte, standortangepasste Mikroalgen-Bakterien-Konsortium in allen vier Sickerwässern kultiviert und die Wachstumsraten gemessen. Die Ergebnisse der einzelnen Arbeitspaketen werden im Folgenden erläutert.

Für ERA<sup>3</sup> wurden insgesamt vier Deponien der Deponieklasse II (siehe Tabelle 2) ausgewählt. Die Auswahl der Deponien richtete sich nach der Herkunft der eingelagerten Abfälle, dem Alter und dem Status der Deponien sowie der Tatsache, dass sämtliche Deponien hinreichend wissenschaftlich untersucht und charakterisiert sein sollten.

Die Leppe Deponie zeichnet sich durch gut charakterisierte, getrennte Deponieabschnitte aus. Sie verfügt über dazu gehörende Sickerwasserabnahmestellen und sogenannte Gasbrunnen mit unterschiedlichen und relativ hohen Ammoniumkonzentrationen.

Die Sickerwasserbehandlung der Deponie Allendorf erfolgt über die Sickerwasserbehandlungsanlage der Deponie Reiskirchen, indem das Sickerwasser von Allendorf nach Reiskirchen mit Saugfahrzeugen gebracht wird.

Tabelle 2: Übersicht der für ERA<sup>3</sup> ausgewählten Deponien

Deponie	Ort	Deponie-klasse	Betreiber	Sickerwasser-behandlung	Status
<b>Leppe (Metabolon)</b>	Lindlar	DK II	BAV	vorhanden	in Betrieb
<b>Reiskirchen</b>	Reiskirchen	DK II	LK Gießen	vorhanden	Nachsorge-phase
<b>Allendorf</b>	Allendorf	DK II	LK Gießen	über Reiskirchen	Nachsorge-phase
<b>Aßlar</b>	Aßlar	DK II	AWLD	vorhanden	in Betrieb

## 1.1. Isolierung und Kultivierung der standortangepassten Mikroalgen

Unter den gegebenen Bedingungen (siehe Anhang) konnten standortangepasste Mikroalgen in allen Deponiesickerwässern isoliert und kultiviert werden. Dabei konnte der in Abbildung 1 dargestellte Versuchsansatz erfolgreich etabliert werden.

Es wurden Sickerwasserproben an unterschiedlichen Anfallstellen auf dem Gelände der jeweiligen Deponien (vgl. Tab. 1) entnommen, zu Mischproben vereinigt und im Labor und in der Klimakammer des Interdisziplinären Forschungszentrums (IFZ) für 20 Tage bei 25 °C, kontinuierlicher Belüftung und bei 12 h Beleuchtung pro Tag in 500 ml Gaswaschflaschen inkubiert.

In den Gaswaschflaschen wird die Algensuspension über eine Glasröhre belüftet. Überschüssige Luft kann über eine zweite Glasröhre entweichen. Um die Verdunstung zu minimieren, ist am Ende der Auslassröhre eine mit Watte gefüllte Spritze befestigt, welche als Kondensationsfalle dient. Beide Glasröhren sind über einen Gummistopfen an der Flasche befestigt.

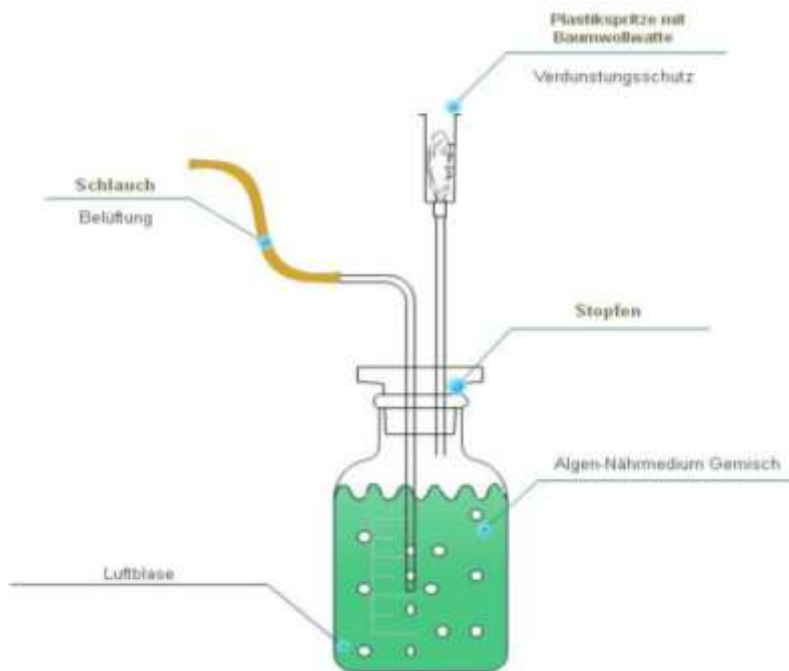


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Versuchsanätze.

## 1.2. Mikroskopische Charakterisierung

Im Anschluss an die Isolierung und Kultivierung der standortangepassten Algen (Punkt 1.1.) wurden die Proben lichtmikroskopisch untersucht und die vorgefundenen Algen identifiziert (Tabelle 3).

Tabelle 3: Probenort und vorgefundene Algenspezies in verschiedenen Deponiesickerwässern der untersuchten DKII-Deponien

Deponie	Probenort	Algenspezies
<b>Leppe</b>	Aufbereitungsanlage	<i>Chlorella</i> sp.
<b>Reiskirchen</b>	Speicherbecken	<i>Chlorella</i> sp.
	Abfluss Deponie	<i>Chlorella</i> sp.
	Aufbereitungsanlage	<i>Chlorella</i> sp.
	Oberflächenwasser	<i>Lemna minor</i> (Wasserlinsen)
<b>Allendorf</b>	Tankcluster	<i>Chlorella</i> sp.
<b>Aßlar</b>	Speicherbecken	<i>Chlorella</i> sp.

Bei den untersuchten Proben wurden ausschließlich *Chlorella* sp. als die primär vorliegende Algenspezies gefunden (Abbildung 2). Im Oberflächenwasser der Deponie Reiskirchen fand man außerdem Wasserpflanzen der Art *Lemna minor* (Wasserlinsen).

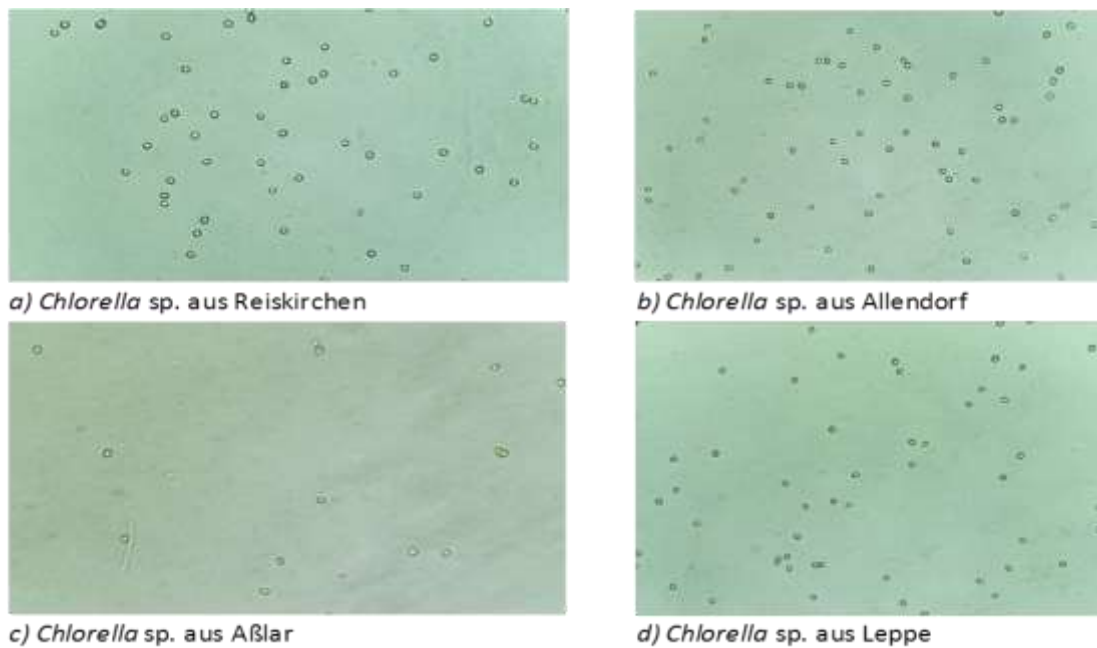


Abbildung 2: Mikroskopische Bilder der Algenspezies der ausgewählten Deponien

### 1.3. Physiologische Charakterisierung

In diesem Arbeitspaket wurde in allen verwendeten Sickerwässern, wie auch in dem von der Deponie Leppe isolierten Algen-Bakterien-Konsortium, *Chlorella* sp. als primäre Algengattung identifiziert. Bei *Chlorella* sp. handelt es sich um eine überwiegend planktonisch lebende, einzellige, nicht freibewegliche, eukaryotische Alge, welche zur Gattung der *Chlorophyta* gehört (Bellinger and Sigee, 2010). Die relativ kleinen, kugelförmigen Zellen haben einen Durchmesser von 1-10  $\mu\text{m}$ . Die Zellen besitzen einen Chloroplasten, der einen Großteil der Zelle ausfüllt.

Die *Chlorella* sp. kommt in nährstoffreichem Süßwasser aber auch in Salz- oder Brackwasser vor. Auch in Böden wurde diese Gattung bereits nachgewiesen, und manche Arten sind in der Lage, große Mengen extrazellulärer, polymerer Substanzen auszuschütten, die zur Bildung von Biofilmen genutzt werden können. Neben der bevorzugten photoautotrophen Lebensweise, kann diese Gattung in einer Licht limitierten Umgebung oder bei Überschuss einer organischen Kohlenstoffquelle mixotroph leben (Bellinger and Sigee, 2010). Obwohl bereits Meiose-codierende Gene bei *C. variabilis* entdeckt wurden, wurde die Fortpflanzung bisher ausschließlich asexuell via Mitose nachgewiesen (Andersen, 2013).

*Chlorella* sp. war 1890 die erste Mikroalge, die in einer Laborkultur isoliert werden konnte ( Beijerinck, 1890). Sie wird in der Grundlagenforschung bereits seit etwa einem Jahrhundert als Modellorganismus eingesetzt (Warburg, 1919). Trotzdem ist die Taxonomie dieser Gattung bisher nicht eindeutig aufgeklärt und bisher wurden mehr als 100 verschiedene Spezies benannt (Bock, Krienitz und Pröschold, 2011). Das hängt vor allem mit den unspezifischen morphologischen und physiologischen Merkmalen zusammen, welche sich mit der Umgebung ändern können (Wu, Hseu and Lin, 2001).

Unterscheidungen wurden bisher vor allem aufgrund der Nährstoffbedürfnisse (Shrift and Sproul, 1963), morphologischer Eigenschaften (FOTT and B., 1969), serologischer Kreuzreaktionen (Sanders, Keller and Wiley, 1971), ultrastruktureller und chemischer Zusammensetzungen der Zellwände (Atkinson, Gunning and John, 1972), der pyrenoid Ultrastruktur (Ikeda and Takeda, 1995), biochemischer und physiologischer Eigenschaften (Kessler and Huss, 1992), molekular

phylogenetischer Eigenschaften (Darienko *et al.*, 2010) oder der chemischen Taxonomie über spezifische Carotinoide (Paliwal *et al.*, 2016) oder Ergosterole (Görs *et al.*, 2010) gemacht. Alle diese Studien haben gezeigt, dass es eine hohe Inkonsistenz hinsichtlich des taxonomischen Systems dieser Gattung gibt.

Aktuell geht man auf der Grundlage biochemischer und molekularer Daten von fünf „echten“ *Chlorella* species aus: *C. vulgaris*, *C. lobophora andrejeva*, *C. sorokiniana shihira et krauss*, *C. heliozoae Pröschold et darienko* and *C. variabilis shihira et krauss* (Krienitz *et al.*, 2004; Pröschold *et al.*, 2011).

Die Wellenlängen, die Algen benötigen um Photosynthese zu betreiben, liegen im Bereich zwischen 400 und 700 nm und können von Algenart zu Algenart variieren. Im Rotlichtbereich absorbiert *C. vulgaris* zwischen 630 und 665 nm, im Bereich des blauen Lichtes von 430 bis 465 nm. Auf diese Weise kann die Zellkonzentration indirekt photometrisch bestimmt werden (Privoznik *et al.* 1978).

Das Temperaturoptimum bei dem die größte Biomasseproduktion von *C. vulgaris* erreicht werden kann, liegt nach Chinnasamy *et al.* (2009) bei einer Temperatur von 30 °C. Converti *et al.* (2009) zeigten, dass bei einer Temperatur von 35°C das Wachstum nur um 17 % geringer ausfiel als es bei 30 °C der Fall war. Ab einer Temperatur von 38 °C führt die Temperatur zum Absterben von *C. vulgaris*. Das natürliche Vorkommen, indem *C. vulgaris* wächst, liegt demnach in einem Temperaturbereich von 15 – 35 °C (Serra-Maia *et al.*, 2016).

*Chlorella* spp. kann in einem pH-Bereich zwischen 4 und 10 überleben (Khalil *et al.*, 2010), während der Bereich für optimales Biomassewachstum zwischen 9 und 10 liegt (Yu *et al.*, 2000). Stickstoff kommt als bioverfügbarer Stoff in unterschiedlichen Formen vor. Die relevantesten Formen sind gelöste Ammonium-, Nitrit- oder Nitratsalze und Harnstoff. Stickstoff existiert als gelöste Ammoniakverbindung im pH-Wert abhängigen Dissoziationsgleichgewicht mit Ammonium-Kationen. Untersuchungen von Kong *et al.* (2011) haben gezeigt, dass Stickstoff in Form von Nitrat zur größten Biomasseproduktion von 3,43 g/L bei *C. vulgaris* führen kann.

## 1.4. Chemische Taxonomie

Dieses Arbeitspaket wurde mit Hilfe der Gentechnik bearbeitet. Die Ergebnisse zeigen, dass mit dieser Methodik auch im Deponiesickerwassermedium das Genom charakterisiert werden kann. Abbildung 4 zeigt einen DNA-Vergleich aus einer Leppes-Probe mit der Referenz der SAG-Göttingen. Die Kürzel C, T, G, A stehen für die Nukleinbasen Cytosin, Thymin, Guanin und Adenin.

Die Untersuchung wurde durchgeführt, um die Reinheit bzw. den Grad der Kontamination der Proben bestimmen zu können. Dazu wurden ITS (Internal Transcribed Spacer) rDNA-Sequenzvergleiche durchgeführt. Mit zwei algenspezifischen PCR-Primern (AL1500af (Primer 1); LR1850 (Primer 2)) wurden die ITS rDNA-Sequenzen aus den Proben bestimmt und mit Hilfe des Online-Tools BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) hinsichtlich ihrer Nukleotid- oder Proteinsequenzen mit Sequenzdatenbanken verglichen.

Durch Vergleich der ermittelten ITS-Sequenz und der 5,8S rRNA-Gensequenz eines zu identifizierenden Algen-Strains mit einer bekannten Referenz werden Sequenzähnlichkeiten bestimmt, die die Reinheit oder Kontamination der Probe eingeschätzt. Die Nukleotidsequenz einer solchen Region beträgt etwa 500-600 Basenpaare. Die für die Amplifizierung des 5,8S rRNA-Gens und des ITS-Genombereiches verwendeten Primer sind universelle Primer, die für diese Genombereiche bei Grünalgen spezifisch sind.



Neben hoch konservierten Bereichen, in denen die Sequenz für alle Grünalgen identisch ist, kommen über den Bereich des 5,8S rRNA und der benachbarten ITS-Region verteilt auch variable Bereiche vor, die als Signatursequenzen für eine Spezies, Gattung oder Gruppe von Algen charakteristisch sein können. Die Analyse dieser Teilsequenzen ermöglicht die taxonomische Zuordnung, um im Rahmen der Nachkontrolle der Versuche, mögliche Verunreinigungen zu überprüfen sowie mögliche Fremdkontaminationen nachweisen zu können.

Abbildung 4 zeigt den Abgleich einer in BLAST eingelesenen Algenprobe. Die mit "N" benannten Basen in "Chlorella sample" zeigen nicht eindeutig lesbare Einheiten, was auf eine im geringen Maße unvollständige PCR an diesen Stellen schließen lässt. Rot gekennzeichnete Buchstaben (Consensus) zeigen die Übereinstimmung der Basenpaare der Probe und der Referenz an. Die hier gezeigte Chlorella-Probe erweist sich als Reinprobe, was sich durch die hohe Übereinstimmung mit der Referenzprobe (*Chlorella* sp.) erkennen lässt. Bei der Betrachtung der Ähnlichkeiten werden entsprechend der Primerregion die ersten 500 Basenpaare als Vergleichsstandard verwendet.

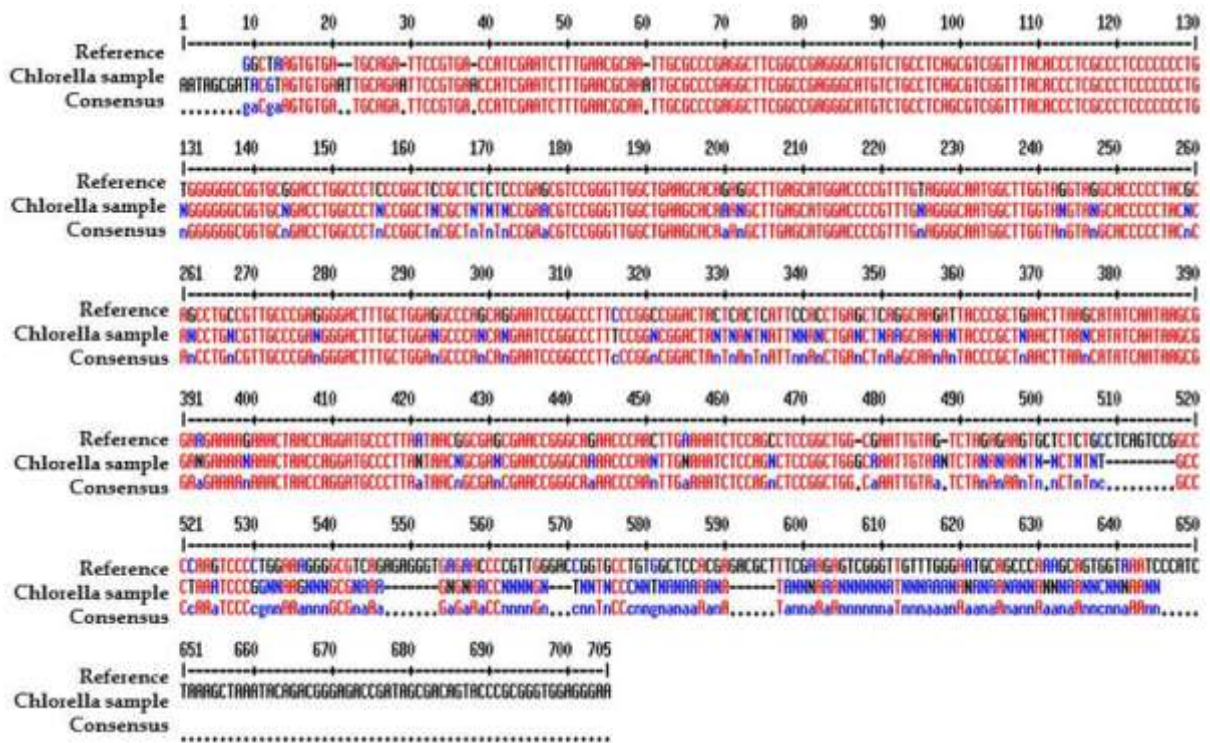


Abbildung 3: Vergleich der Sequenzen einer der gefundenen Algenspezies im standortangepassten Mikroalgen-Bakterien-Konsortium der Deponie Leppe und eines Referenzgenoms von *Chlorella* sp. der SAG-Göttingen (Auszug)

In der zweiten Projektphase soll die Charakterisierung der standortangepassten Mikroalgen-Bakterien-Konsortien auf der Grundlage genetischer Untersuchungen fortgesetzt werden. Zunächst sollen verschiedene Proben mit Hilfe einer Metabiom-Analyse durch externes NGS (Next Generation Sequencing Verfahren) analysiert werden. Auf diese Weise kann ein Überblick über die verschiedenen Bakterien- und Mikroalgenarten erhalten werden (Community Analyse). Zur kontinuierlichen qualitativen Analyse einzelner Spezies sollen in Phase II eigene PCR-Analysen und Gelelektrophoresen durchgeführt werden. Dazu wird vor der PCR-Analyse die Bestimmung der DNA-Menge benötigt, um über entsprechend angepasste Verdünnung die PCR korrekt durchführen zu können. Dazu wurde ein Fluorometer eingesetzt, das Qubit 4 von ThermoFisher Scientific, welches für Versuche bereits in Phase I des Projektes erworben wurde.

## 1.5. Kultivierung der Algen in verschiedenen Deponiesickerwässern

Die Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist, das vom Standort Leppe isolierte Mikroalgen-Bakterien-Konsortium in allen vier unverdünnten, nicht vorbehandelten Sickerwässern (siehe „Kulturmedien“ auf Seite 74) zu kultivieren.

Die Verläufe des Algenwachstums, gemessen an der Extinktion bei 680nm (linke y-Achse) und dem korrelierten Trockengewicht pro Liter (rechte y-Achse), sind in Abbildung 4 dargestellt. Mikroalgenwachstum konnte in allen mit dem Mikroalgen-Bakterien-Konsortium der Deponie Leppe inokulierten Kulturen (IC) und allen nicht damit inokulierten Kontrollkulturen (CC) nachgewiesen werden. Die Inokulation mit dem standortangepassten Mikroalgen-Bakterien-Konsortium hatte einen signifikanten Effekt ( $\alpha=0,05$ ) auf die Biomassemenge während der ersten 13 Tage.

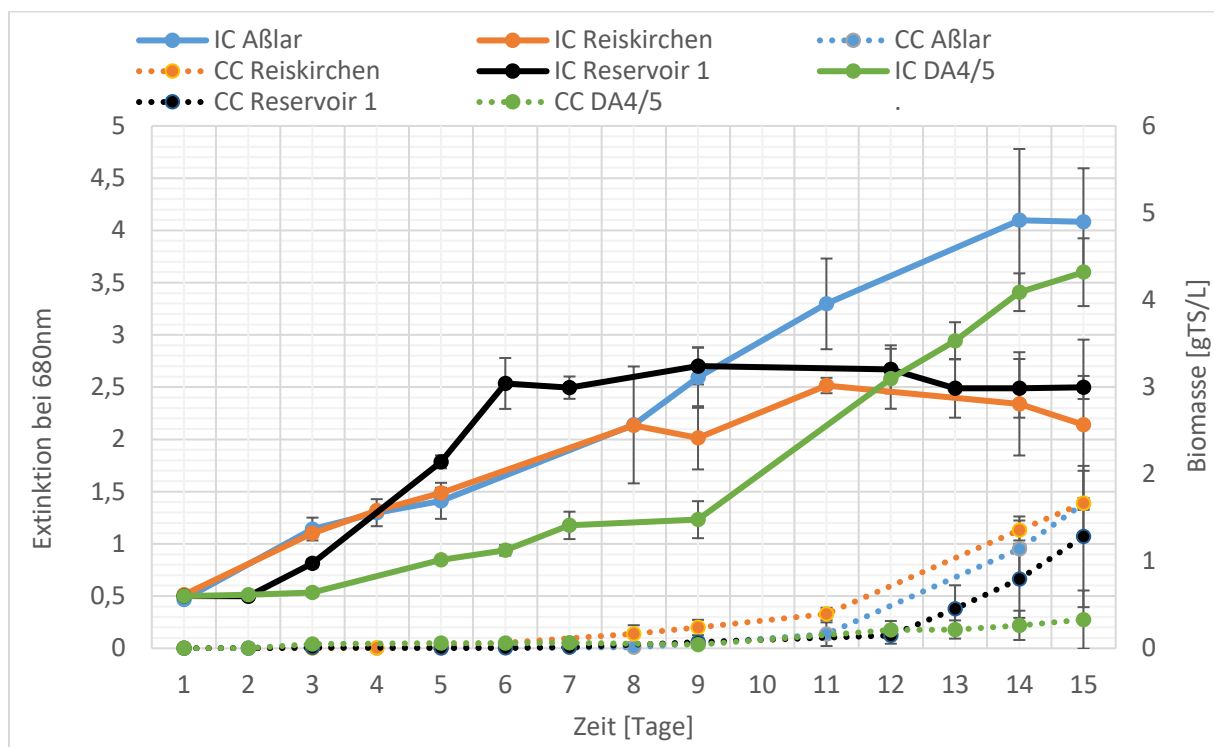


Abbildung 4: Wachstumskurven der Mikroalgen in verschiedenen Sickerwässern; IC: Inokulierte Kulturen; CC: Kontrollkulturen (ohne Inokulation)

Die Wachstumskurven der Mikroalgenkulturen waren vom eingesetzten Sickerwasser abhängig. Wie in Tabelle 1 dargestellt, wurden die höchsten Wachstumsraten in den inokulierten Kulturen des Sickerwassers „Reservoir 1“ der Deponie Leppe an Tag 4 erhalten. Hier war die maximale Wachstumsrate mit 1,2 g TS/(L\*Tag) viermal höher als in der Kultur „IC Reiskirchen“, nahm aber nach Tag 6 rapide ab. Im Vergleich dazu zeigten die Algen in den höher mit Ammonium und organischen Verbindungen (CSB) belasteten Sickerwässern „IC DA 4/5“ und „IC Reiskirchen“ ein wesentlich kontinuierlicheres Wachstum (Belastungen der Sickerwässer siehe auch Tabelle 16, Seite 75). Hier wurden die höchsten durchschnittlichen Wachstumsraten über den 15-tägigen Kultivierungszeitraum von 0,3 und 0,26 g TS/(L\*Tag) sowie die höchsten Biomassekonzentrationen nach 15 tägiger Kultivierungszeit erzielt.

Tabelle 4: Maximale, mittlere- und akkumulierte Wachstumsraten der inokulierten Kulturen innerhalb des 15-tägigen Kultivierungszeitraums

	IC Reservoir 1	IC DA4/5	IC Aßlar	IC Reiskirchen
<b>Maximum [gTS/(L*Tag)]</b>	1.20	0.58	0.65	0.37
<b>Mittlere Wachstumsrate [gTS/(L*Tag)]</b>	0.16 (± 0,39)	0.26 (± 0,23)	0.30 (± 0,16)	0.13 (± 0,21)
<b>akkumulierte Wachstumsrate [gTS/L]</b>	2.63	4.08	4.76	2.14

#### Reproduzierbarkeit der Wachstumsraten

Um die Wiederholbarkeit der im Arbeitspaket 1.5 demonstrierten Wachstumsraten zu überprüfen (siehe auch Tabelle 4), wurden zwei weitere Experimente unter identischen Kultivierungsbedingungen durchgeführt. Hier konnte in allen Fällen eine maximale Wachstumsrate von 0,6 – 0,9 g TM\*L<sup>-1</sup>\*Tag<sup>-1</sup> reproduziert werden, was dem im Projektantrag formulierten „Kriterium für eine erfolgreiche Phase I des Projektes ERA<sup>3</sup>“ entspricht. Die Wachstumsraten ergeben sich dabei, wie im Abschnitt „Versuchsaufbau der Arbeitspakete“ auf Seite 85 dargestellt, als Biomassedifferenz zwischen dem jeweilig angegeben Tag „X“ und dem Folgetag.

#### Sickerwasser Deponie Leppe (Entnahmepunkt DA 4/5)

In Abbildung 5 sind Wachstumsverlauf und Wachstumsraten des ersten Reproduktionsversuches dargestellt. Die höchsten Wachstumsraten von ca. 0,93 gTS/(L\*Tag) konnten zu Beginn der exponentiellen Phase zwischen Tag 11 und 12 ermittelt werden.

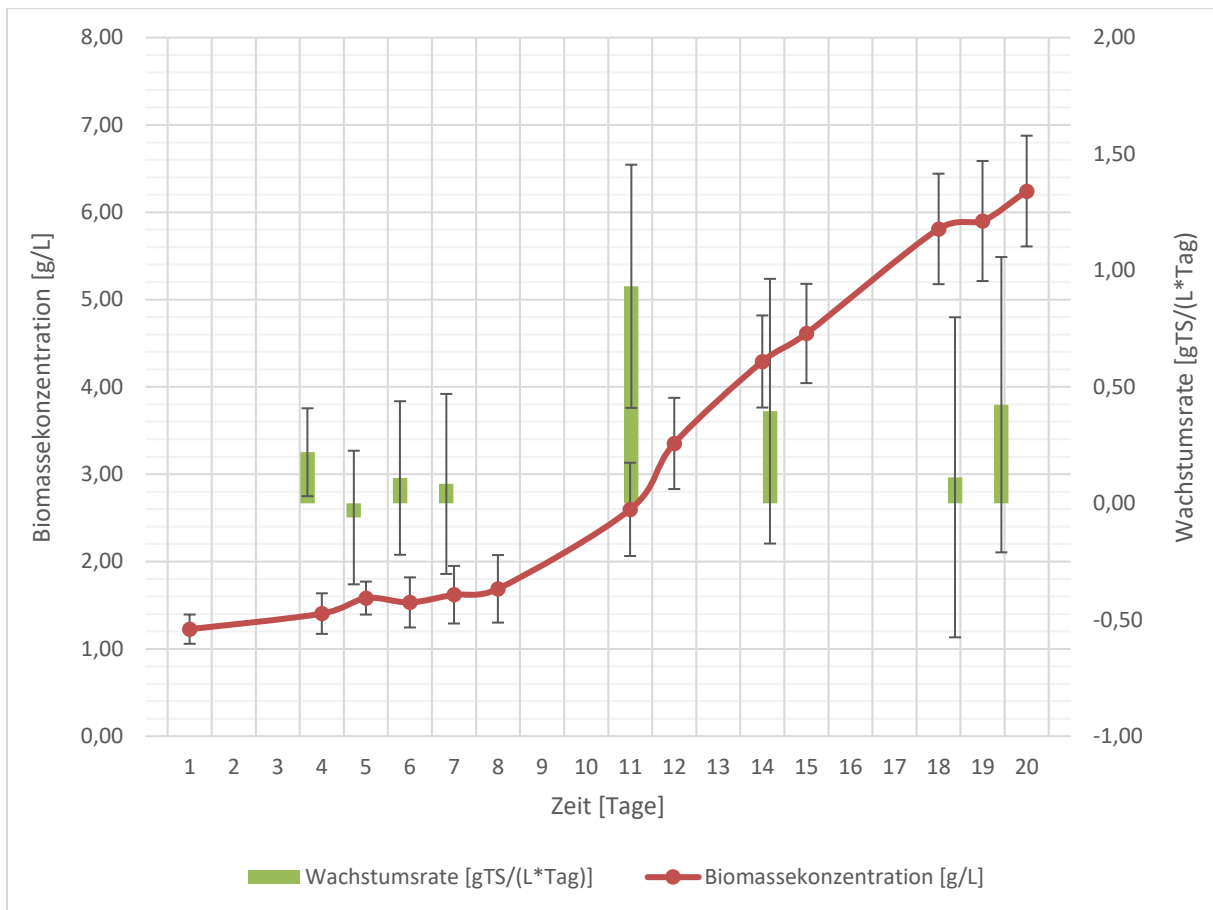


Abbildung 5: Verläufe von Wachstumsraten (rechte y-Achse, grüne Balken) und Biomassekonzentrationen (linke y-Achse, rote Linie) einer Algenkultur im Sickerwasser der Deponie Leppe vom Entnahmepunkt „DA4/5“ über den 20-tägigen Versuchszeitraum

#### Sickerwasser Deponie Leppe (Entnahmepunkt: Reservoir 1)

Der Wachstumsverlauf des zweiten Reproduktionsversuches ist in Abbildung 6 gezeigt. Die höchsten Wachstumsraten von ca. 1,14 gTS/(L\*T) konnten gegen Ende der exponentiellen Phase, zwischen Tag 5 und 6, erreicht werden.

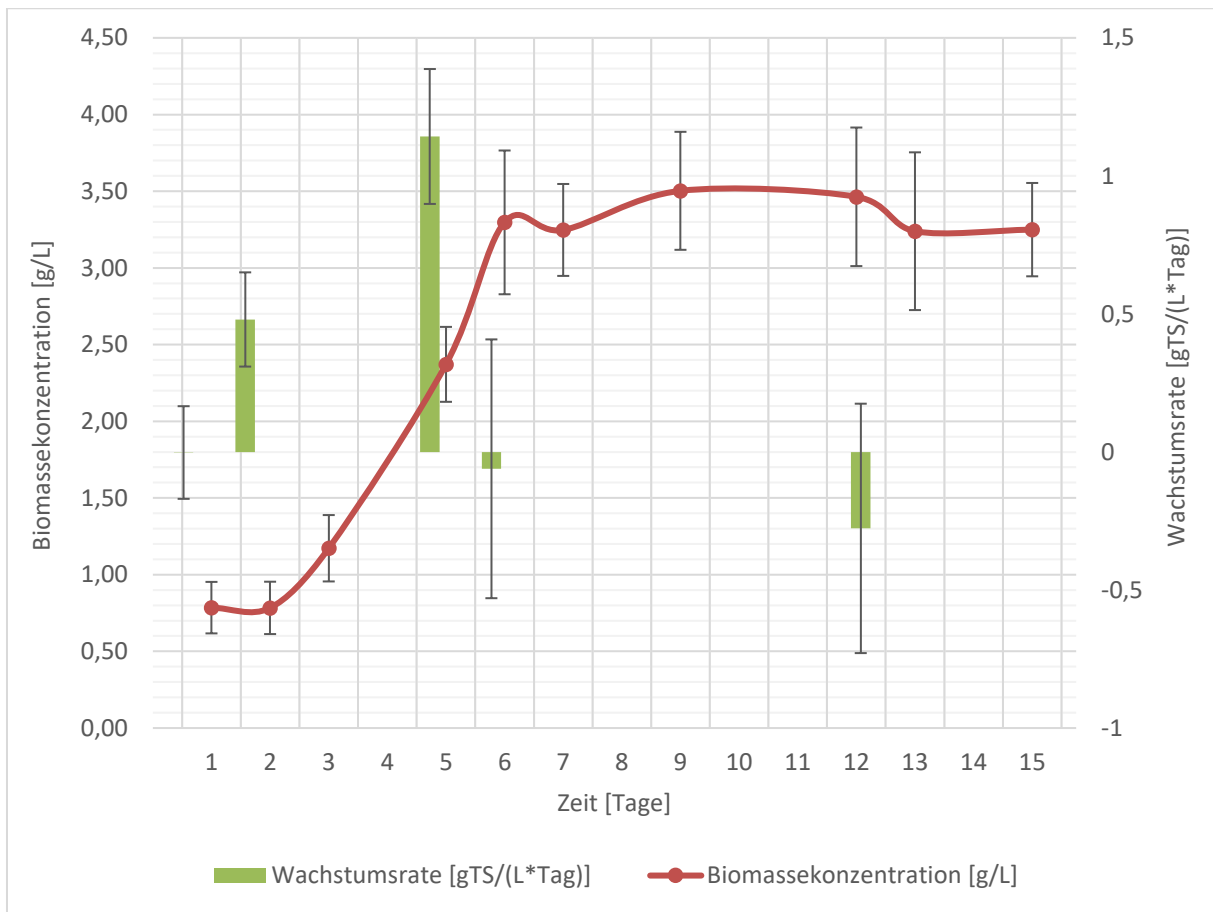


Abbildung 6: Verläufe von Wachstumsraten (rechte y-Achse, grüne Balken) und Biomassekonzentrationen (linke y-Achse, rote Linie) einer Algenkultur im Sickerwasser der Deponie Leppe vom Entnahmepunkt „Reservoir 1“ über den 20-tägigen Versuchszeitraum

## 2. Arbeitspaket - Parametererfassung für optimale Kultivierungstechniken

Im Arbeitspaket 2 sollten die Parameter für eine optimale Kultivierung der Algen in den Sickerwässern ermittelt werden. Dazu wurde im AP 2.1 zunächst die Abhängigkeit des Algenwachstums von den zentralen Wachstumsfaktoren pH-Wert, Temperatur und Lichtintensität getestet. Anschließend wurden im AP 2.2 die Abbauraten der abwasserrelevanten Inhaltsstoffe Ammonium, Nitrit, Nitrat, Phosphat und der CSB-Wert untersucht. Im AP 2.3 wurde der Versuchsmaßstab, der sich bisher auf Laborersuche beschränkte, in den 120-L IBC-Maßstab angehoben. Dabei wurden unterschiedliche Kultivierungssysteme (Batch, Raceway und biofilmbasierte Kultivierung) miteinander verglichen. Im Arbeitspaket 2.4 wurden abschließend die Ergebnisse aller bisherigen Arbeitspakete diskutiert.

### 2.1. Parameterabhängige Wachstumsraten

#### Versuchsreihe Temperatur

##### **Absorptionswerte**

Die Versuchsansätze der **Versuchsreihe 18 °C** (Abbildung 7) zeigen ein ausgeprägtes Wachstum in der Positiv-Kontrolle  $F_{1/2}$ . Alle Ansätze mit Sickerwasser weisen im Vergleich dazu ein deutlich geringeres Wachstum auf. Die Sickerwassermatrix mit der höchsten Wachstumsrate im Versuchszeitraum war in dieser Versuchsreihe das Sickerwasser aus Reiskirchen mit einem maximalen Absorptionswert von 1,57 an Tag 15. Im Vergleich dazu hatte das  $F_{1/2}$ -Medium eine maximale Wachstumsrate an Tag 16 mit einem Absorptionswert von 3,05. Hier wurde somit doppelt so viel Biomasse aufgebaut wie im Sickerwasser der Deponie Reiskirchen. Einen vergleichbaren maximalen Absorptionswert wie das Sickerwasser Reiskirchen hatte das Sickerwasser aus Aßlar mit einem Absorptionswert von 1,5 an Tag 18. Den niedrigsten maximalen Absorptionswert hatte das Sickerwasser der Leppe Deponie :metabolon mit 1,23 an Tag 18.

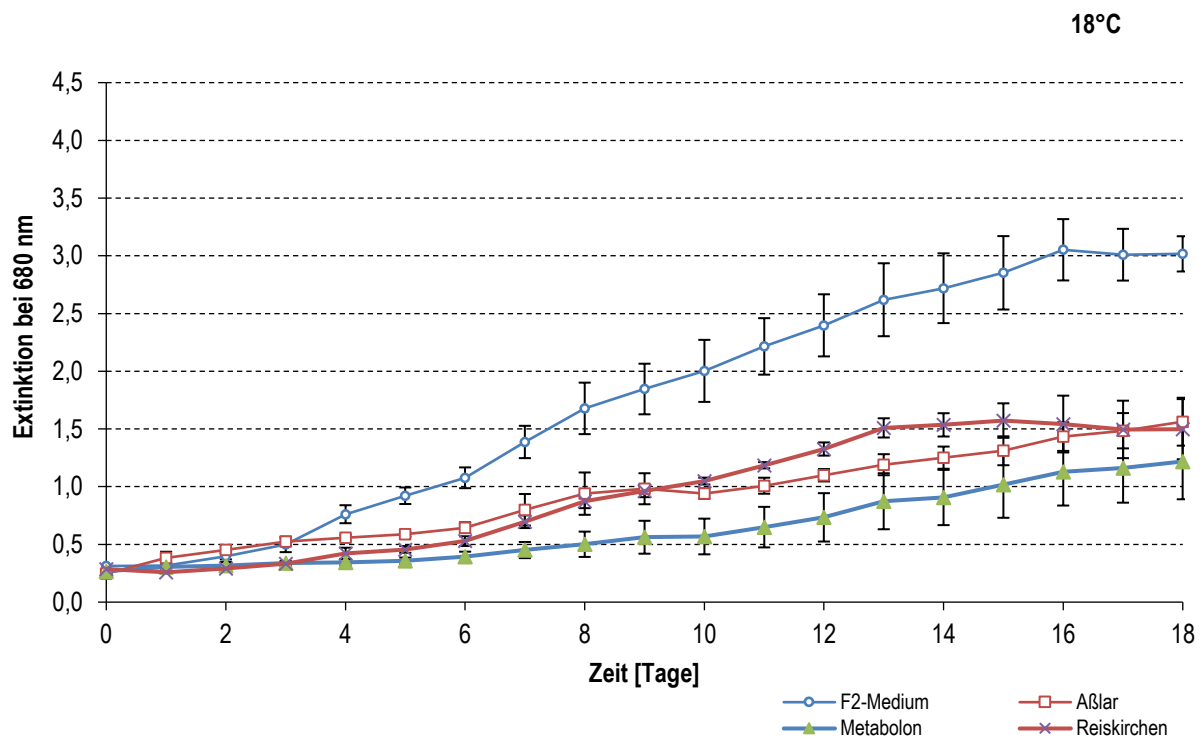


Abbildung 7: Photometrisch gemessene Absorptionswerte (ABS) im Zeitraum von 18 Tagen bei 688 nm bei 18 °C, einfacher Beleuchtung und in verschiedenen Deponiesickerwassermedien

Bei der Versuchsreihe mit 25 °C (Abbildung 3) hatte das Sickerwasser aus Reiskirchen erneut die höchsten Absorptionswerte aller Sickerwässer. Im Vergleich zur „Versuchsreihe 18 °C“ konnte die maximale Absorption auf 1,81 an Tag 17 gesteigert werden. Das Sickerwasser mit der zweithöchsten Absorption war das Sickerwasser der Deponie Leppe, welches den maximalen Absorptionswert an Tag 15 bei 1,36 erreichte. Die geringsten maximalen Wachstumsraten von 0,78 wurden im Sickerwasser der Deponie Aßlar an Tag 16 erzielt.

Die Kontrollgruppe hatte demgegenüber im Vergleich zur Kontrollgruppe der Versuchsreihe 18 °C einen flacheren Verlauf. Hier wurde die höchste Zelldichte von 0,91 bereits an Tag 6 erreicht.

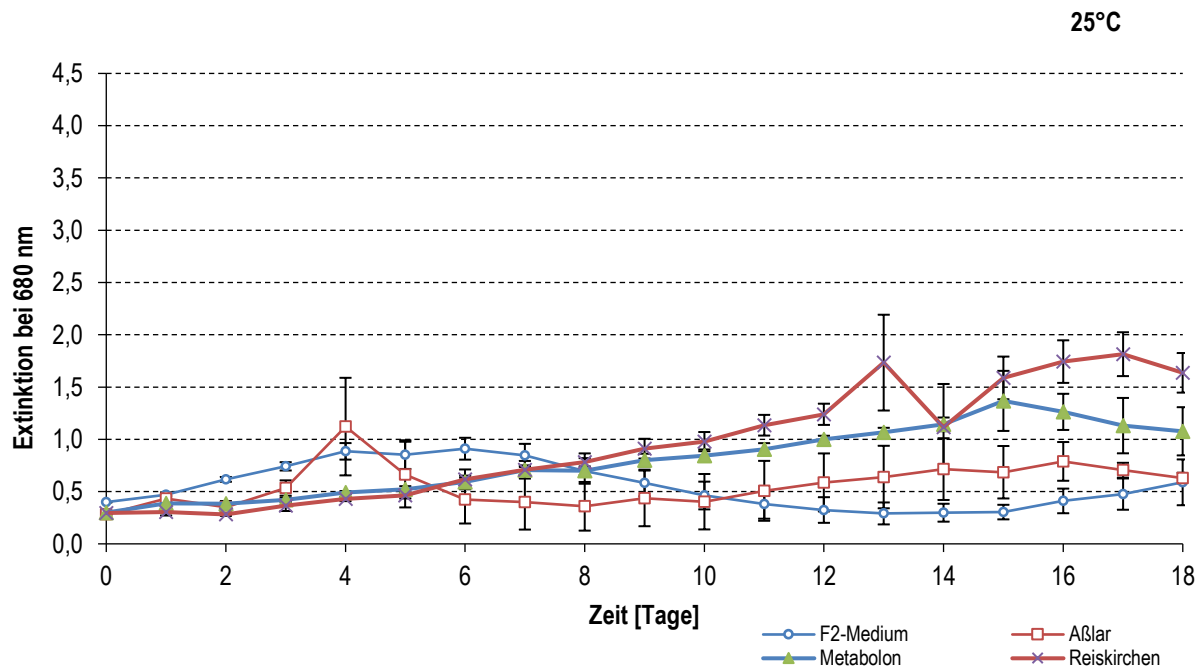


Abbildung 8: Photometrisch gemessene Absorptionswerte (ABS) im Zeitraum von 25 Tagen bei 688 nm bei 25 °C, einfacher Beleuchtung und in verschiedenen Deponiesickerwassermedien

Das Sickerwasser der Deponie Aßlar hatte bei der Versuchsreihe 30 °C (Abbildung 9) den höchsten Absorptionswert bei 1,46 an Tag 14. Den zweithöchsten Wachstumsverlauf hatte die Kontrollgruppe mit dem  $F_{2-}$ Medium mit einem Maximum von 0,91 an Tag 13.

Das Sickerwasser der Deponie Leppe erreichte einen Wert von 0,80 an Tag 13. Einen deutlich flacheren Wachstumsverlauf zeigte das Sickerwasser aus Reiskirchen mit einem Maximum von 0,39 an Tag 6 mit einer anschließenden Reduktion der Absorptionswerte. Die Absorptionsmaxima der Ansätze sind in Tabelle 5 zusammengefasst.



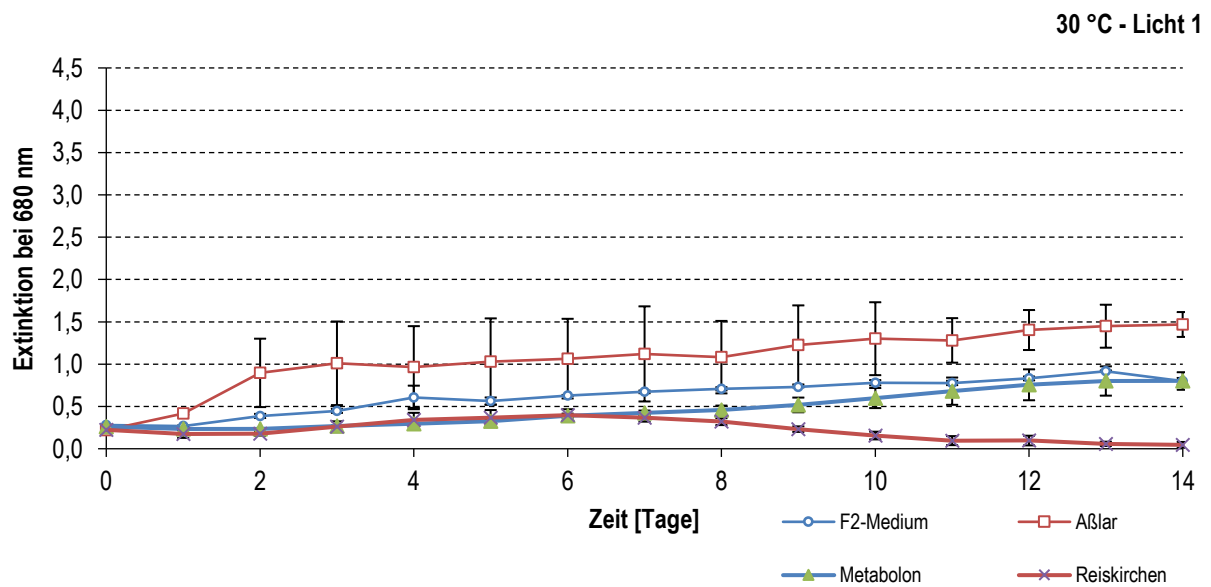


Abbildung 9: Photometrisch gemessene Absorptionswerte (ABS) im Zeitraum von 14 Tagen bei 688 nm, 30 °C, einfacher Beleuchtung und verschiedenen Deponiesickerwassermedien

Tabelle 5: Zusammenfassende Übersicht zu den Absorptionsmaxima der unterschiedlichen Sickerwässer bei unterschiedlichen Temperaturen und einfacher Beleuchtungsintensität

Sickerwasser	18 °C	25 °C	30 °C
Metabolon	1,23	1,36	0,80
Aßlar	1,49	0,78	1,46
Reiskirchen	1,57	1,81	0,39

## Versuchsreihe Licht

### Absorptionswerte

Die **Versuchsreihe bei 18 °C** und doppelter Beleuchtungsintensität (Abbildung 5) zeigte wie bei der Versuchsreihe 18 °C und einfacher Beleuchtung den höchsten Wachstumsverlauf der Positiv-Kontrolle  $F_{1/2}$  mit einem Absorptionsmaxima von 4,03 an Tag 18. Das Sickerwasser mit dem höchsten Absorptionsmaximum war das Sickerwasser aus Aßlar mit 2,40 ebenfalls an Tag 18. Das Sickerwasser von :metabolon hatte ein Maximum von 1,96 (Tag 18) und Reiskirchen von 1,76 an Tag 13.

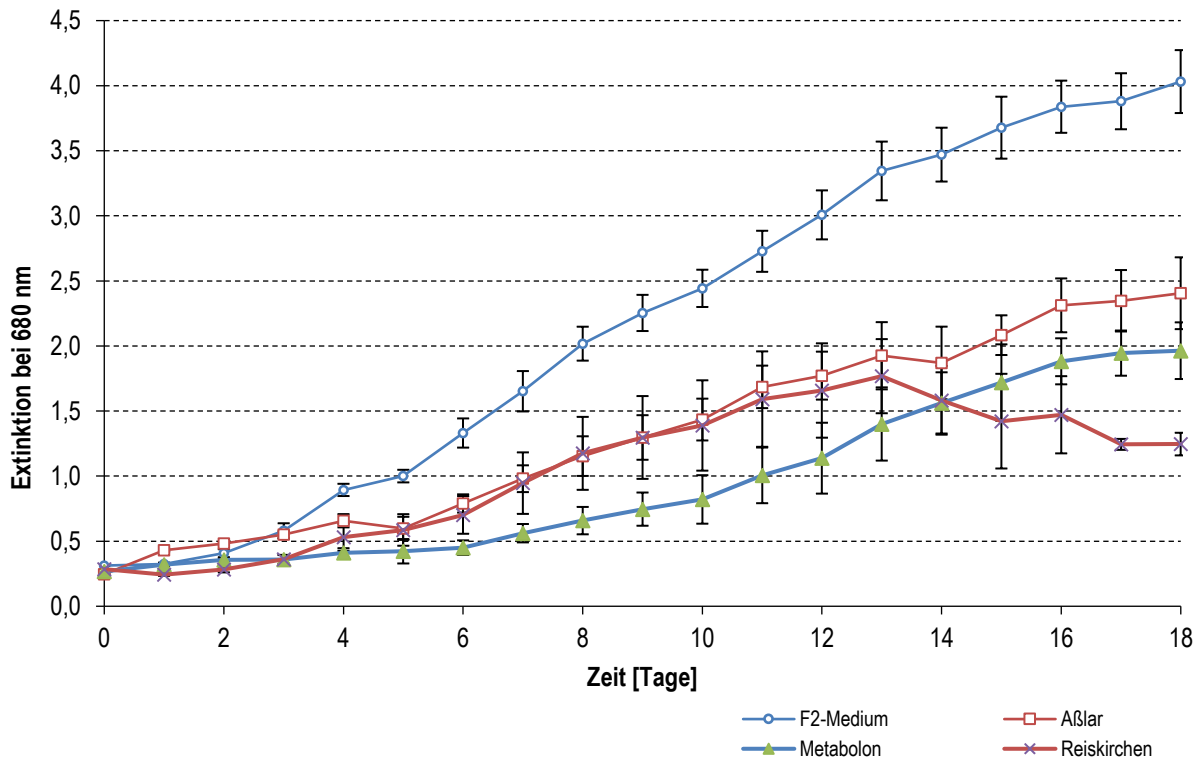


Abbildung 10: Photometrisch gemessene Absorptionswerte (ABS) im Zeitraum von 18 Tagen bei 688 nm, bei 18 °C, doppelter Beleuchtung und mit verschiedenen Deponiesickerwassermedien

Bei der **Versuchsreihe 25 °C** und doppelter Beleuchtung (Abbildung 6) hatte das Sickerwasser aus Reiskirchen die höchsten Absorptionswerte (2,48 an Tag 13), gefolgt von Aßlar mit 2,37 an Tag 16. Das Sickerwasser von :metabolon hatte sein Maximum an Tag 14 mit einem Wert von 1,81.

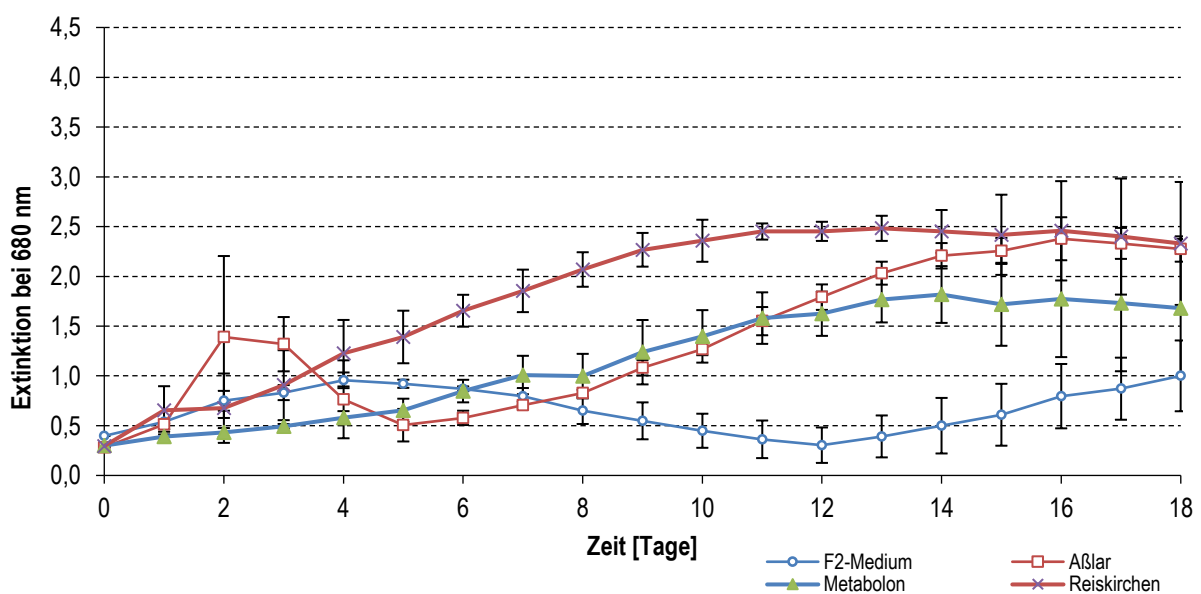


Abbildung 11: Photometrisch gemessene Absorptionswerte (ABS) im Zeitraum von 18 Tagen bei 688 nm, bei 25 °C, doppelter Beleuchtung und mit verschiedenen Deponiesickerwassermedien

Das Sickerwasser aus Aßlar hatte bei der **Versuchsreihe 30 °C** und doppelter Beleuchtung (Abb. 7) die höchsten Absorptionswerte (1,67 an Tag 10), gefolgt vom Sickerwasser von :metabolon (1,36 an Tag 10).

Die Kontrollgruppe F<sub>2</sub> zeigte einen vergleichsweise flacheren Verlauf mit einem Maximum an Tag 9 mit 0,98. Das Sickerwasser aus Reiskirchen zeigte demgegenüber nur ein kurzes Wachstum mit einem Maximum an Tag 3 mit 0,43 und einer anschließenden Reduktion der Absorptionswerte ab Tag 4. Die Absorptionsmaxima der einzelnen Ansätze mit doppelter Beleuchtung sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

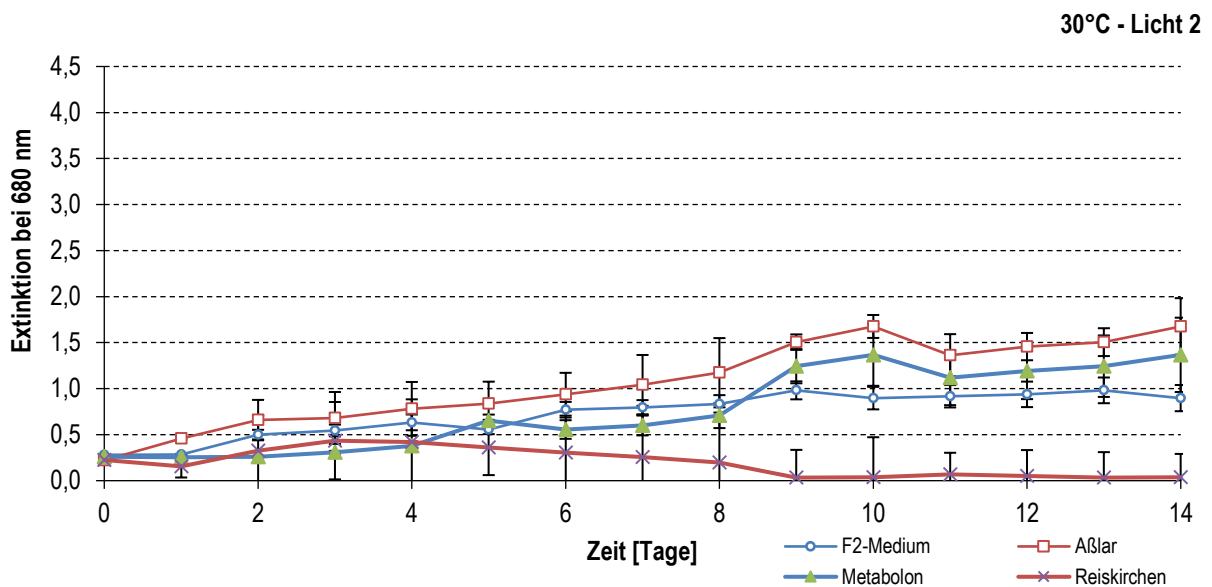


Abbildung 12: Photometrisch gemessene Absorptionswerte (ABS) im Zeitraum von 14 Tagen bei 688 nm, 30 °C, doppelter Beleuchtung und mit verschiedenen Deponiesickerwassermedien

Tabelle 6: Zusammenfassende Übersicht der Absorptionsmaxima der unterschiedlichen Deponiesickerwässer bei Temperaturen von 18°C-30°C und doppelter Beleuchtungsintensität

Sickerwasser	18 °C	25 °C	30 °C
Metabolon	1,96	1,82	1,37
Aßlar	2,41	2,38	1,68
Reiskirchen	1,77	2,48	0,43

### Versuchsreihe Optimum pH-Wert

#### **Absorptionswerte**

Die Absorptionswerte bei unterschiedlichen pH-Werten im Sickerwasser der Leppe Deponie sind in Abbildung 17 dargestellt. Bis Tag 8 zeigten die unterschiedlichen pH-Werte einen ähnlichen Wachstumsverlauf. Ab Tag 9 stagnierten die Werte bei pH 6.5, während die pH-Werte 7 und 8 weiter anstiegen. Am Ende des Versuches, an Tag 13, verzeichnete pH-Wert 8 die höchsten Absorptionswerte noch vor einem pH-Wert von 7.

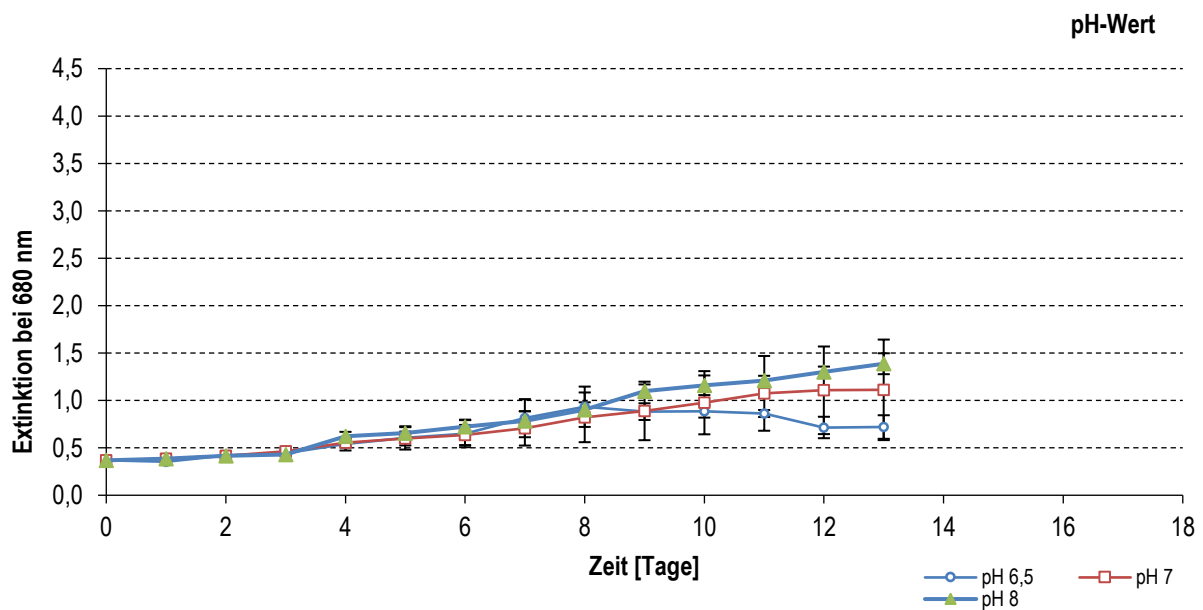


Abbildung 13: Photometrisch gemessene Absorptionswerte (ABS) im Deponiesickerwasser von :metabolon bei verschiedenen pH-Werten, im Zeitraum von 13 Tagen bei 688 nm, bei 30 °C und doppelter Beleuchtung

## 2.2. Abbauraten von Abwasserinhaltsstoffen durch Mikroalgen

Im Arbeitspaket 2.2 wurde untersucht, inwiefern sich das Wachstum des standortangepassten Mikroalgen-Bakterien-Konsortiums der Deponie Leppe auf die Konzentrationen abwasserrelevanter Inhaltsstoffe in vier verschiedenen Deponiesickerwässern auswirkte.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Inokulation mit dem Mikroalgen-Bakterien-Konsortium der Deponie Leppe zu einer signifikanten Reduktion ( $p < 0,05$ ) der abwasserrelevanten Inhaltsstoffe Nitrit, Nitrat, Phosphat sowie organischer Verbindungen (CSB) im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Inokulation führte. Zwischen der inokulierten- und nicht inokulierten Kontrollgruppe wurde jedoch kein signifikanter Unterschied ( $p > 0,05$ ) hinsichtlich der Reduktion von Ammonium festgestellt.

Im Durchschnitt nahmen die Konzentrationen von  $\text{PO}_4^{3-}$  - P und  $\text{NH}_4^+$  - N in allen Kulturen ab, während die Konzentrationen von  $\text{NO}_2^-$  - N und  $\text{NO}_3^-$  - N anstiegen. Der mittlere CSB-Wert sank in allen inokulierten Kulturen, während er in allen nicht inokulierten Kontrollkulturen zunahm.

Im Folgenden werden die gemessenen Konzentrationsverläufe der oben genannten Inhaltsstoffe im Einzelnen vorgestellt.

### Ammonium-Stickstoff

Der Verlauf der  $\text{NH}_4^+$ -N Konzentrationen ist in Abbildung 14 dargestellt. Während der 15-tägigen Kultivierungsphase nahm die  $\text{NH}_4^+$ -N Konzentration in allen Kulturen ab. Allerdings zeigte die Inokulation mit dem standortangepassten Mikroalgen-Bakterien-Konsortium keinen signifikanten Unterschied ( $p > 0,05$ ) zu den Kontrollkulturen. Die Unterschiede der beiden Kontrollgruppen sind in [Tabelle 7](#) dargestellt.

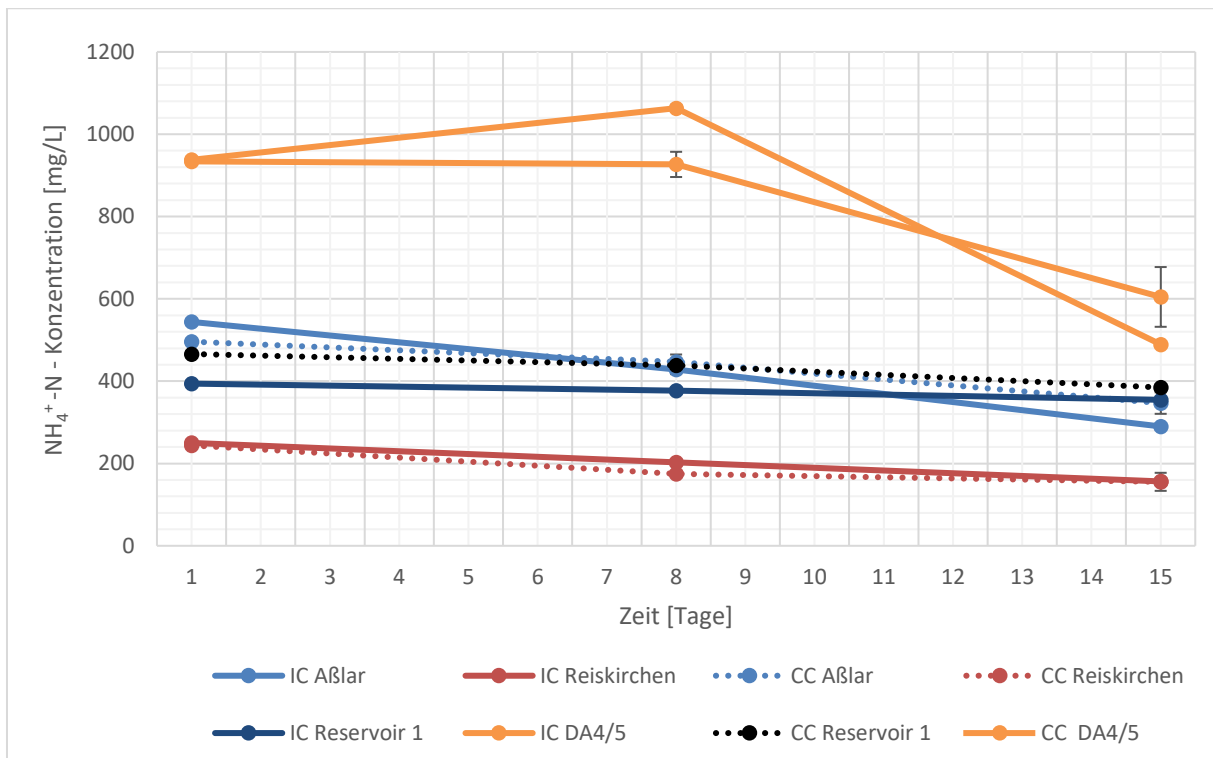


Abbildung 14: Ammonium-Stickstoffkonzentrationen während des 15-tägigen Versuchszeitraums in den jeweiligen Sickerwässern; IC: Inokulierte Kulturen; CC: Kontrollkulturen (nicht-inokulierte Kulturen)

Tabelle 7: T-test und U-test (Mann-Whitney-Test) der Unterschiede zwischen inokulierten Kulturen (IC) und Kontrollkulturen (CC). Mittelwerte der Ammonium-Sickstoffkonzentrationen mit Standardabweichungen aller getesteter Sickerwässer; Statistische Signifikanz ist durch unterschiedliche, hochgestellte Buchstaben angezeigt.

Tag	Lindlar Reservoir 1		Lindlar DA 4/5		Aßlar		Reiskirchen	
	IC	CC	IC	CC	IC	CC	IC	CC
<b>1</b>	394,34 ±0,00	466,09 ±0,00	934,01 ±000	908,67 ±0,00	544,87 ±0,00	496,23 ±0,00	250,71 <sup>a</sup> ±0,00	244 <sup>a</sup> ±0,00
<b>8</b>	377,01 <sup>a</sup> ±4,16	438,74 <sup>b</sup> ±8,33	926,67 <sup>a</sup> ±208,7	1063,33 <sup>a</sup> ±30,62	428,04 <sup>a</sup> ±11,55	446,00 <sup>a</sup> ±18,15	202,67 <sup>a</sup> ±2,31	174,82 <sup>a</sup> ±5,82
<b>15</b>	354,70 <sup>a</sup> ±7,57	384,00 <sup>a</sup> ±4,62	604,02 <sup>a</sup> ±91,13	489,33 <sup>a</sup> ±72,59	290,73 <sup>a</sup> ±7,21	346,67 <sup>b</sup> ±26,03	156,47 <sup>a</sup> ±4,31	155,4 <sup>a</sup> ±21,91

### Nitrit-Stickstoff

Der Verlauf der  $\text{NO}_2^-$ -N Konzentrationen ist in Abbildung 15 dargestellt. Während der 15-tägigen Kultivierungsphase stieg die Konzentration in allen Kulturen an, abgesehen von der Kultur „Reservoir 1“. Die Inokulation mit dem Mikroalgen-Bakterien-Konsortium führte jedoch in allen Fällen, im Vergleich zu der Kontrollkultur ohne Algeninokulation, zu signifikant geringeren ( $p < 0,05$ ) Konzentrationen an den Tagen 8 und 15. Die Unterschiede zwischen den beiden Kontrollgruppen sind in Tabelle 8 dargestellt.

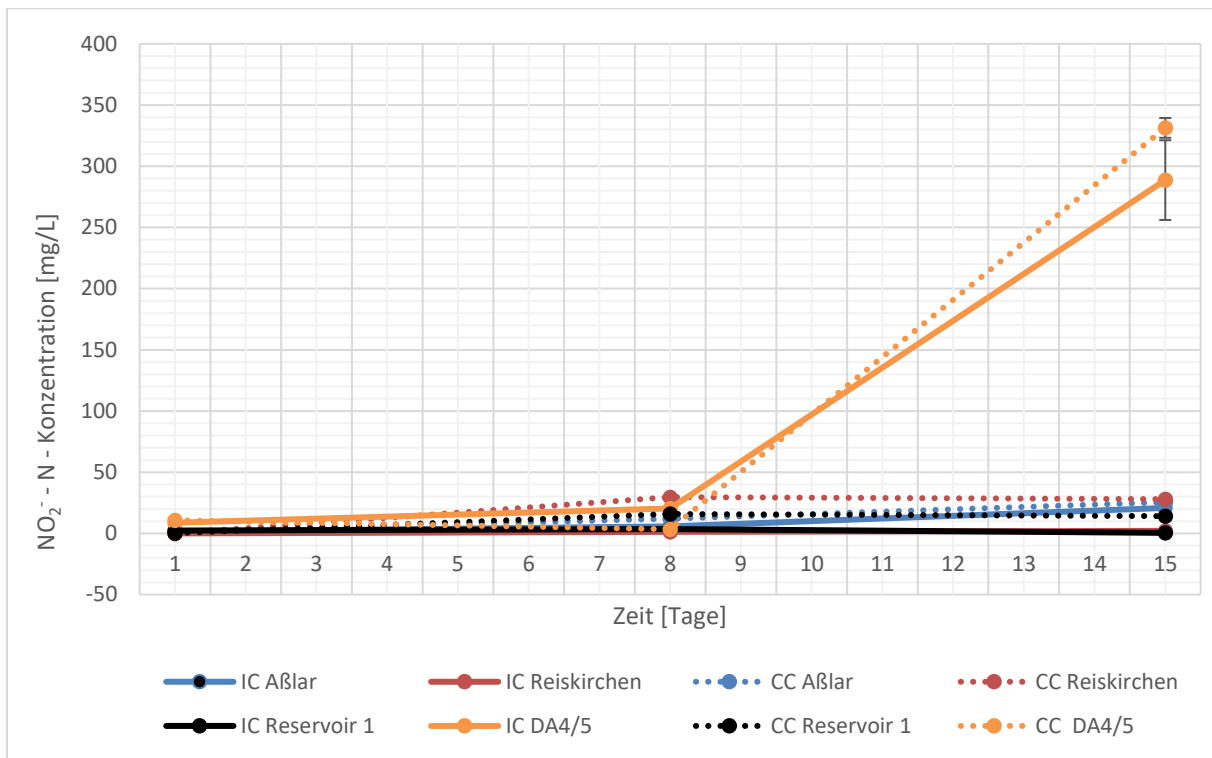


Abbildung 15: Nitrit-Stickstoffkonzentrationen während des 15-tägigen Versuchszeitraums in den jeweiligen Sickerwässern; IC: Inokulierte Kulturen; CC: Kontrollkulturen (nicht-inokulierte Kulturen)

Tabelle 8: T-Test und U-Test (Mann-Whitney-Test) auf Unterschiede zwischen inokulierten Kulturen (IC) und Kontrollkulturen (CC). Mittelwerte der Nitrit-Sickstoffkonzentrationen mit Standardabweichungen aller getesteten Sickerwässer; Statistische Signifikanz ist durch unterschiedliche, hochgestellte Buchstaben angezeigt.

Tag	Lindlar Reservoir 1	Lindlar DA 4/5		Aßlar	Reiskirchen			
	IC	CC	IC	CC	IC	CC	IC	
1	2,24 ±0,00	0,28 ±0,00	8,74 ±0,00	10,8 ±0,00	1,30 ±0,00	1,32 ±0,00	0,01 ±0,00	0,00 ±0,00
8	3,54 <sup>a</sup> ±0,27	15,86 <sup>b</sup> ±2,96	20,30 <sup>a</sup> ±9,66	3,403 <sup>b</sup> ±0,98	5,873 <sup>a</sup> ±0,11	11,95 <sup>a</sup> ±5,21	1,21 <sup>a</sup> ±0,27	29,67 <sup>b</sup> ±3,19
15	0,44 <sup>a</sup> ±0,40	14,15 <sup>b</sup> ±1,05	288,67 <sup>a</sup> ±32,58	331,33 <sup>a</sup> ±8,08	20,82 <sup>a</sup> ±6,10	25,47 <sup>a</sup> ±2,73	2,06 <sup>a</sup> ±1,15	27,94 <sup>b</sup> ±7,26

### Nitrat-Stickstoff

Der Verlauf der  $\text{NO}_3^-$ -N Konzentrationen ist in Abbildung 16 dargestellt. Während der 15-tägigen Kultivierungsphase sind die  $\text{NO}_3^-$ -Konzentrationen in allen Kulturen stark angestiegen. Die Inokulation mit dem standortangepassten Mikroalgen-Bakterien-Konsortium führte in den meisten Sickerwässern zu signifikant geringeren ( $p < 0,05$ )  $\text{NO}_3^-$ -Konzentrationen nach 15-tägiger Kultivierungsdauer. Allerdings zeigten die Verläufe in dem Sickerwasser DA4/5 ein entgegengesetztes Verhalten. Hier war die mittlere  $\text{NO}_3^-$ -Konzentration nach 15-tägiger Kultivierung in den inokulierten Kulturen wesentlich höher als in der Kontrollgruppe.

Die Unterschiede beider Kontrollgruppen sind in Tabelle 9 gegenübergestellt.

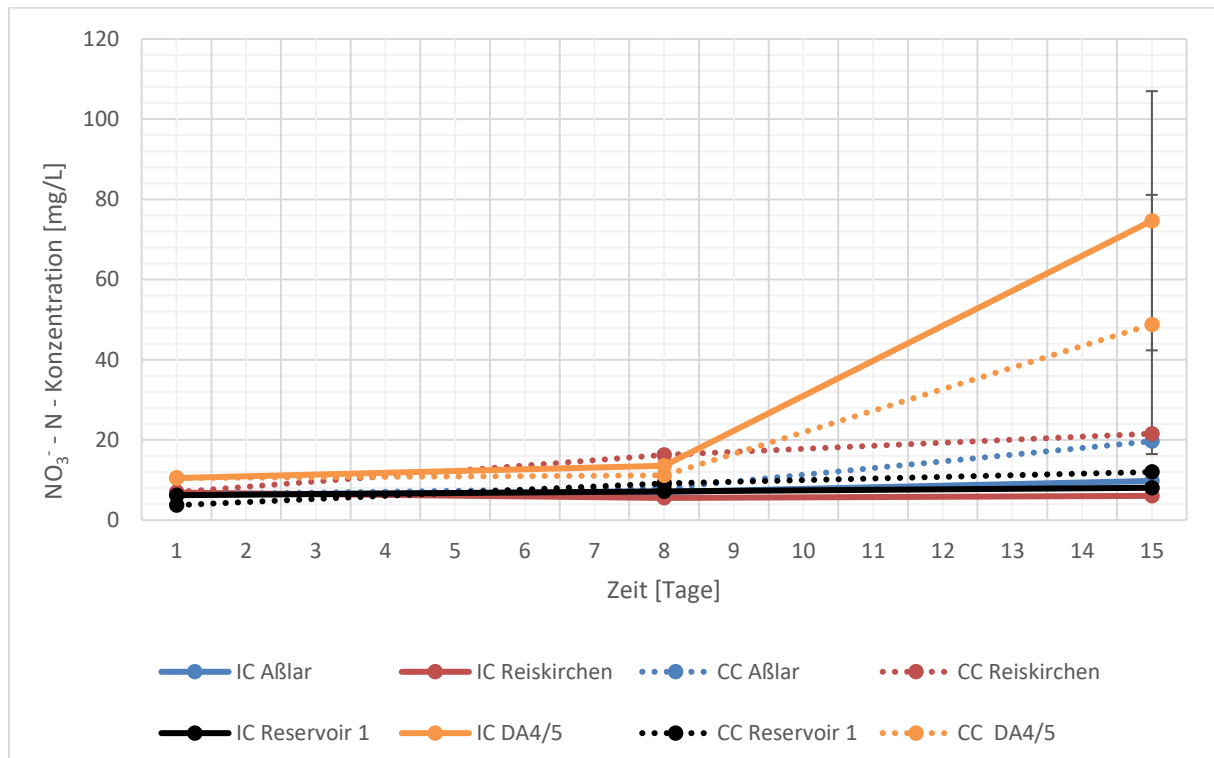


Abbildung 16: Nitrat-Stickstoffkonzentrationen während des 15-tägigen Versuchszeitraums in den jeweiligen Sickerwässern; IC: Inokulierte Kulturen; CC: Kontrollkulturen (nicht-inokulierte Kulturen)

Tabelle 9: T-Test und U-Test (Mann-Whitney-Test) auf Unterschiede zwischen den inokulierten Kulturen (IC) und den Kontrollkulturen (CC). Mittelwerte der Nitrat-Sickstoffkonzentrationen mit Standardabweichungen aller getesteten Sickerwässer; Statistische Signifikanz ist durch unterschiedliche, hochgestellte Buchstaben angezeigt.

Tag	Lindlar Reservoir 1		Lindlar DA 4/5		Aßlar		Reiskirchen	
	IC	CC	IC	CC	IC	CC	IC	CC
1	6,22 ±0,00	3,72 ±0,00	10,5 ±0,00	10,5 ±0,00	6,38 ±0,00	6,42 ±0,00	6,86 ±0,00	6,98 ±0,00
8	7,13 <sup>a</sup> ±0,38	9,13 <sup>a</sup> ±3,98	13,57 <sup>a</sup> ±1,15	11,17 <sup>b</sup> ±0,25	7,01 <sup>a</sup> ±0,22	7,95 <sup>a</sup> ±0,88	5,53 <sup>a</sup> ±0,45	16,29 <sup>a</sup> ±4,37
15	8,067 <sup>a</sup> ±0,40	12,01 <sup>b</sup> ±0,65	74,67 <sup>a</sup> ±32,33	48,80 <sup>a</sup> ±4,44	9,77 <sup>a</sup> ±1,01	19,67 <sup>b</sup> ±2,35	6,08 <sup>a</sup> ±0,97	21,57 <sup>b</sup> ±7,07

### Orthophosphat-Phosphor

Der Verlauf der  $PO_4^{3-}$ -P Konzentrationen ist in Abbildung 17 dargestellt. Während der 15-tägigen Kultivierungsphase sank die  $PO_4^{3-}$  Konzentration in allen Kulturen stark ab. Die Inokulation mit dem Mikroalgen-Bakterien-Konsortium führte in drei der vier untersuchten Sickerwässer zu signifikant geringeren ( $p < 0,05$ ) Konzentrationen im Vergleich zur Kontrollkultur. Die Unterschiede zwischen beiden Kontrollgruppen sind in Tabelle 10 gegenübergestellt.

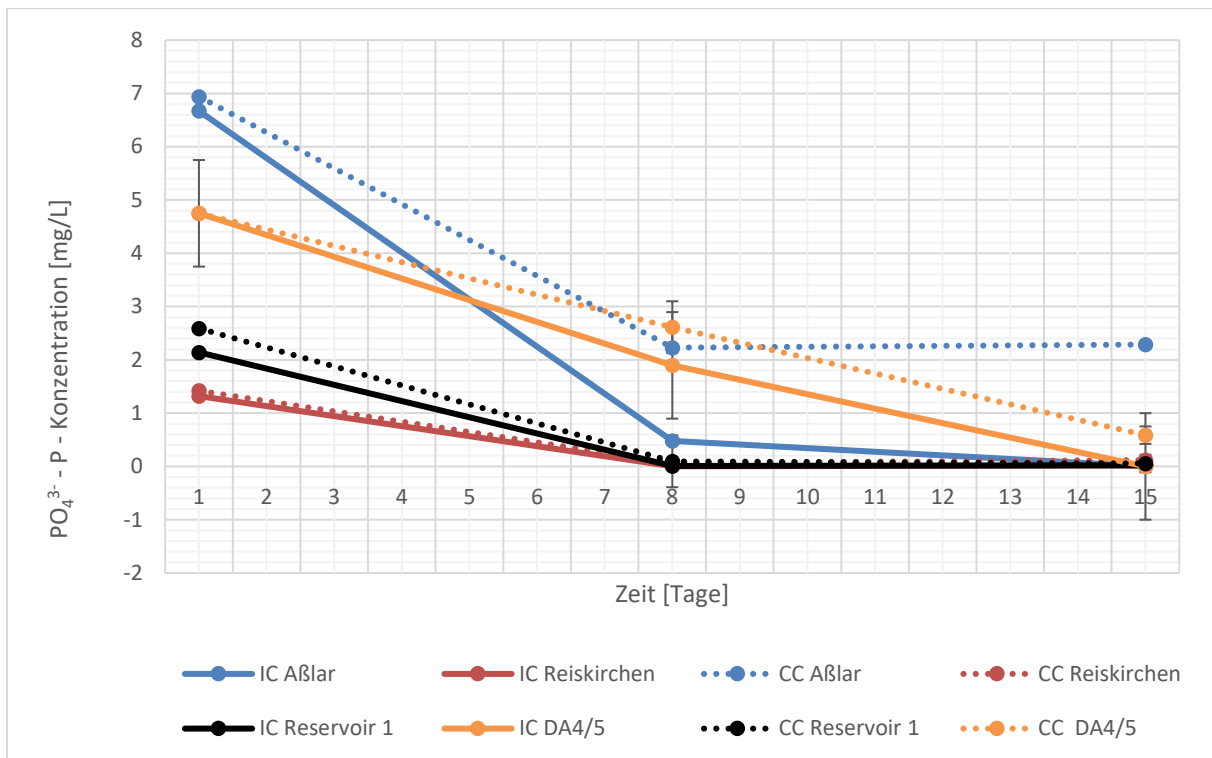


Abbildung 17: Ortho-Phosphat-Phosphor Konzentrationen während des 15-tägigen Versuchszeitraums in den jeweiligen Sickerwässern; IC: Inokulierte Kulturen; CC: Kontrollkulturen (nicht-inokulierte Kulturen)

Tabelle 10: T-Test und U-Test (Mann-Whitney-Test) auf Unterschiede zwischen inokulierten Kulturen (IC) und Kontrollkulturen (CC). Mittelwerte der ortho-Phosphat-Phosphor Konzentrationen mit Standardabweichungen aller getesteten Sickerwässer; Statistische Signifikanz ist durch unterschiedliche, hochgestellte Buchstaben angezeigt.

Tag	Lindlar Reservoir 1		Lindlar DA 4/5		Aßlar		Reiskirchen	
	IC	CC	IC	CC	IC	CC	IC	CC
1	2,14 ±0,00	2,59 ±0,00	4,75 ±0,00	4,75 ±0,00	6,67 ±0,00	6,94 ±0,00	1,32 ±0,00	1,42 ±0,00
8	0,01 <sup>a</sup> ±0,00	0,10 <sup>a</sup> ±0,08	1,90 <sup>a</sup> ±0,45	2,61 <sup>a</sup> ±0,49	0,48 <sup>a</sup> ±0,32	2,23 <sup>b</sup> ±0,34	0,00 <sup>a</sup> ±0,00	0,07 <sup>a</sup> ±0,05
15	0,02 <sup>a</sup> ±0,01	0,06 <sup>b</sup> ±0,01	0,00 <sup>a</sup> ±0,00	0,59 <sup>b</sup> ±0,16	0,00 <sup>a</sup> ±0,01	2,29 <sup>b</sup> ±0,55	0,01 <sup>a</sup> ±0,01	0,12 <sup>a</sup> ±0,13

### Chemischer Sauerstoffbedarf (CSB)

Der Verlauf der CSB-Werte ist in Abbildung 18 dargestellt. Während des 15-tägigen Kultivierungszeitraums sank der CSB-Wert in fast allen Kulturen ab. Die Inokulation mit dem standortangepassten Mikroalgen-Bakterien-Konsortium führte im Vergleich zu den Kontrollkulturen ohne Inokulation zu signifikant geringeren CSB-Werten ( $p < 0,05$ ) nach 15-tägiger Kultivierungszeit. Nur im Sickerwasser „Reservoir 1“ der Deponie Leppe gab es keinen signifikanten Unterschied. Die Unterschiede zwischen beiden Kontrollgruppen sind in Tabelle 11 gegenübergestellt.



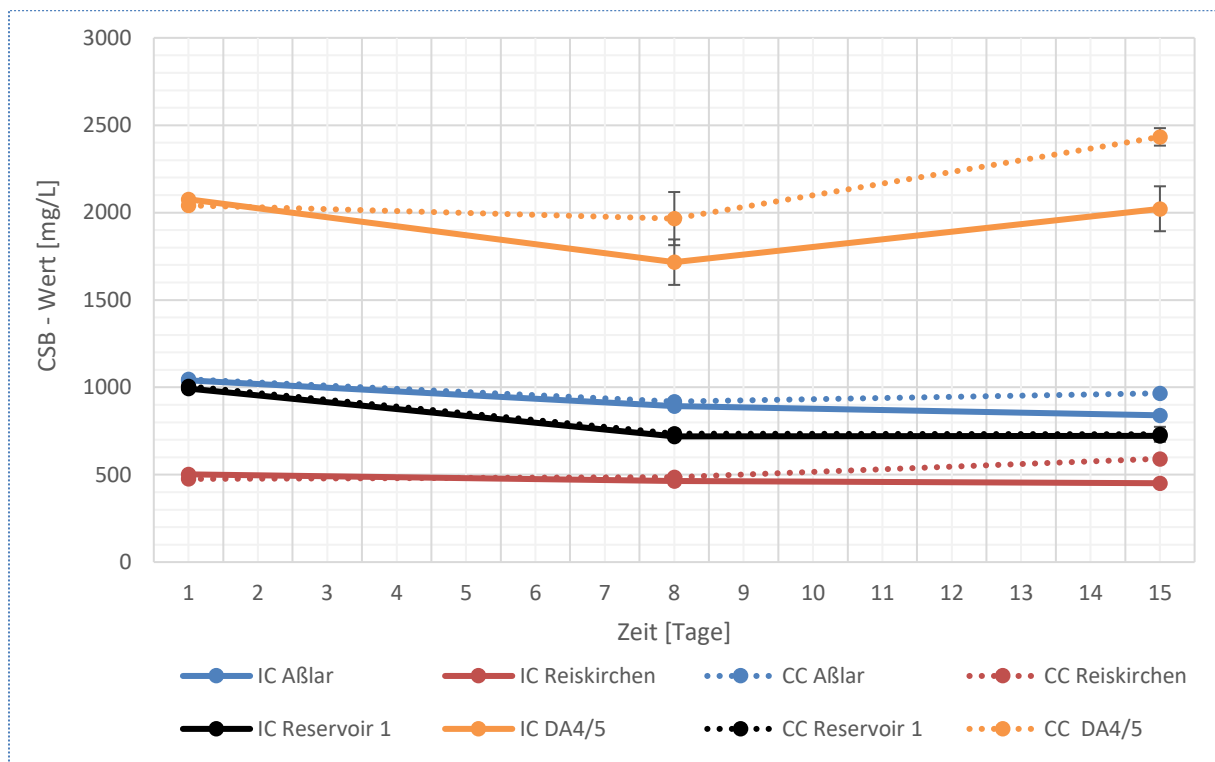


Abbildung 18: CSB-Werte während des 15-tägigen Versuchszeitraums in den jeweiligen Sickerwässern; IC: Inokulierte Kulturen; CC: Kontrollkulturen (nicht-inokulierte Kulturen)

Tabelle 11: T-Test und U-Test (Mann-Whitney-Test) auf Unterschiede zwischen inokulierten Kulturen (IC) und Kontrollkulturen (CC). Mittelwerte der Ammonium-Sickstoffkonzentrationen mit Standardabweichungen aller getesteten Sickerwässer; Statistische Signifikanz ist durch unterschiedliche, hochgestellte Buchstaben angezeigt.

Tag	Lindlar Reservoir 1	Lindlar DA 4/5		Aßlar	Reiskirchen			
	IC	CC	IC	IC	CC	IC	CC	
1	993,00 0,00	1006,00 ±0,00	2076,00 ±0,00	2042,00 ±0,00	1040,00 ±0,00	1046,00 ±0,00	502,00 ±0,00	476,00 ±0,00
8	719,33 <sup>a</sup> ±4,62	734,67 <sup>a</sup> ±23,69	1716,33 <sup>a</sup> ±130,09	1965 <sup>a</sup> ±152,02	892,00 <sup>a</sup> ±12,49	918,67 <sup>a</sup> ±16,65	464,67 <sup>a</sup> ±4,62	486,00 <sup>a</sup> ±72,58
15	722,67 <sup>a</sup> ±21,20	731,33 <sup>a</sup> ±42,72	2022,00 <sup>a</sup> ±128,56	2433,33 <sup>b</sup> ±49,97	840,00 <sup>a</sup> ±6,93	966,67 <sup>b</sup> ±20,43	451,33 <sup>a</sup> ±75,70	591,33 <sup>b</sup> ±60,01

## Abbaukinetik zu den Versuchen aus Arbeitspaket 2.1

Parallel zu den Versuchen an der TH-Köln wurden auch an der Universität Gießen die Abbauraten abwasserrelevanter Inhaltsstoffe auf der Basis der in Arbeitspaket 2.1 beschriebenen Versuche durchgeführt. Es wurde dabei zusätzlich der Einfluss unterschiedlicher Temperaturen und pH-Werte auf die Abbauraten untersucht. Diese Analysen wurden zum einen im Sickerwasser der Deponie Leppe (Reservoir 1) und zum anderen in den Sickerwässern der Deponien Aßlar und Reiskirchen durchgeführt. Die Ergebnisse für die verschiedenen Wachstumsmedien sind im Folgenden dargestellt.

### Sickerwasser der Deponie in Lindlar (Deponie Leppe, Entnahmepunkt Reservoir 1)

Die Analyse des Sickerwassers der Leppe Deponie zeigt im Vergleich zum Rohsickerwasser eine Abnahme der Ammonium-Stickstoff-Konzentration ( $\text{NH}_4\text{-N}$ ) in allen Versuchsansätzen mit einfacher und doppelter Beleuchtung bei 18 °C (Abbildung 19) bei 25 °C (Abbildung 20) und 30°C (Abbildung 21).

Die Nitrit-Stickstoff-Konzentration ( $\text{NO}_2\text{-N}$ ) nahm in den Ansätzen bei der Versuchsreihe 18 °C zu. Die Nitrat-Stickstoff Konzentration ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ) lag zum Ende des Versuches ebenfalls höher als zu Beginn des Versuches, jedoch auf einem ähnlichen Niveau.

Der ortho-Phosphat-Phosphor ( $\text{PO}_4\text{-P}$ ) lag in allen Versuchsvarianten, auch im Rohsickerwasser unterhalb der Nachweisgrenze des Küvetten-Tests.

Die Kalium-Konzentration reduzierte sich ebenfalls im Vergleich zur Ausgangskonzentration in beiden Ansätzen.

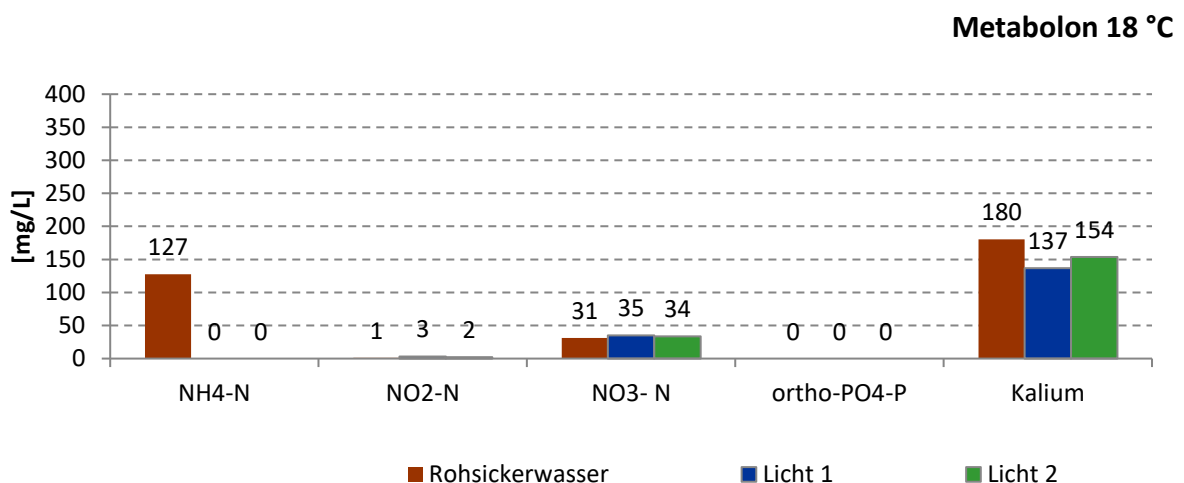


Abbildung 19: Ergebnisse der Wasseranalysen der Versuchsansätze des Sickerwassers Metabolon bei 18 °C mit einfacher und doppelter Beleuchtung

In der **Versuchsreihe 25 °C** des Sickerwassers Metabolon war  $\text{NO}_2\text{-N}$  unterhalb der Nachweisgrenze, lediglich in den Ansätzen der doppelten Beleuchtung konnte gegen Ende des Versuches  $\text{NO}_2\text{-N}$  nachgewiesen werden. Die Messung von  $\text{NO}_3\text{-N}$  ergab ebenfalls eine Reduktion in den beiden Lichtansätzen, wobei  $\text{NO}_3\text{-N}$  in den Ansätzen der doppelten Beleuchtung nicht mehr nachweisbar war. Der  $\text{PO}_4\text{-P}$  hatte zu Beginn des Versuches eine Konzentration von 6 mg/L, welcher am Ende in beiden Ansätzen nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Die Kaliumkonzentration wurde ebenfalls in beiden Versuchsreihen reduziert.

## Metabolon 25 °C

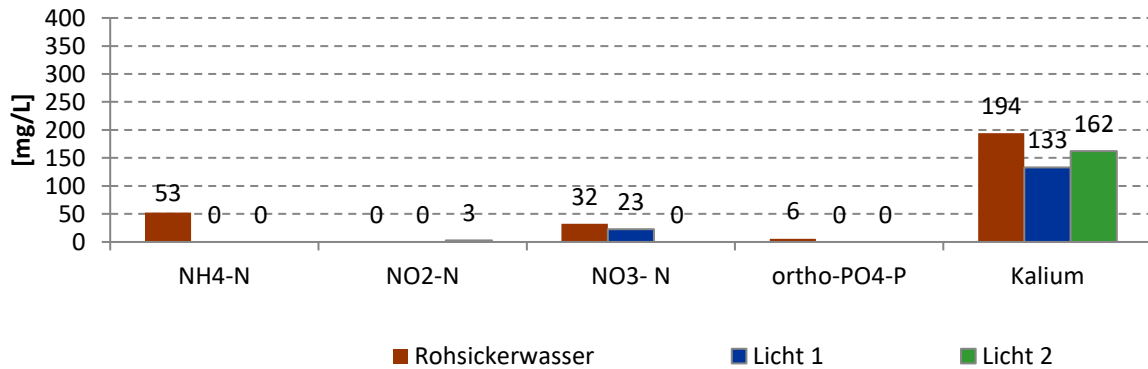


Abbildung 20: Ergebnisse der Wasseranalysen der Versuchsansätze des Sickerwassers Metabolon bei 25 °C mit einfacher und doppelter Beleuchtung

In den Versuchsansätzen des Sickerwassers Metabolon der **Versuchsreihe 30 °C** kam es ebenfalls in beiden Versuchsreihen zu einem Abbau von  $\text{NO}_2\text{-N}$ . Die Konzentration von  $\text{NO}_3\text{-N}$  konnte reduziert werden, blieb jedoch auf einem ähnlich hohen Niveau.

Die Messung von  $\text{PO}_4^- \text{-P}$  ergab eine Konzentration im Rohsickerwasser, die unterhalb des Messbereiches lag, auch in den Versuchsreihen am Ende des Versuches.

Die Kaliumkonzentration nahm auch in diesen Versuchsreihen im Vergleich zum Rohsickerwasser ab, wobei die Konzentration in den Ansätzen mit doppelter Beleuchtung niedriger war, als bei den Ansätzen mit einfacher Beleuchtung.

## Metabolon 30 °C

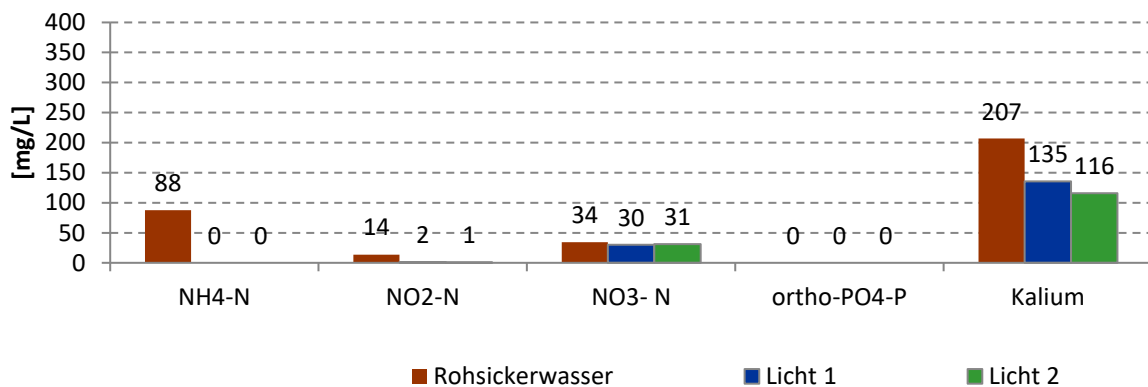


Abbildung 21: Ergebnisse der Wasseranalysen der Versuchsansätze des Sickerwassers Metabolon bei 30 °C mit einfacher und doppelter Beleuchtung

### Sickerwasser der Deponie Reiskirchen

In der **Versuchsreihe 18 °C** des Sickerwassers der Deponie Reiskirchen (Abbildung 22) konnte die Ammonium-Konzentration in beiden Beleuchtungsansätzen stark reduziert werden.

$\text{NO}_2\text{-N}$  war sowohl im Rohsickerwasser als auch am Ende des Versuches unterhalb des Messbereiches.  $\text{NO}_3\text{-N}$  blieb am Ende des Versuches in beiden Ansätzen auf einem vergleichbaren Niveau wie das Rohsickerwasser zu Anfang des Versuches und konnte nur geringfügig reduziert werden.

PO<sub>4</sub>-P war in allen Ansätzen unterhalb des Messbereiches.

Die Kaliumkonzentration in den Ansätzen mit doppelter Beleuchtung wurde reduziert, wohingegen eine Erhöhung der Kaliumkonzentration in den Ansätzen mit einfacher Beleuchtung gemessen wurde.

### Reiskirchen 18 °C

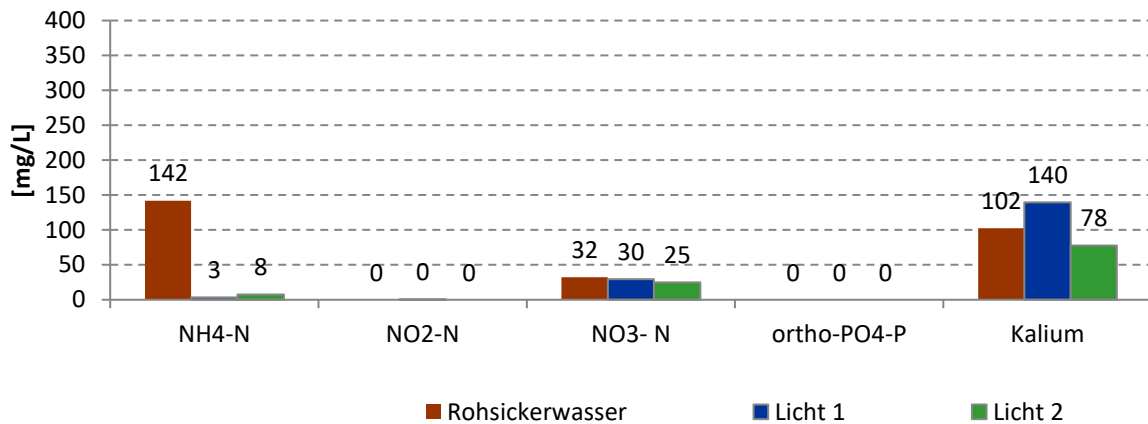


Abbildung 22: Analyse verschiedener Wasserparameter der Versuchsansätze der Sickerwasser Reiskirchen bei 18 °C mit einfacher und doppelter Beleuchtung

In den Versuchsansätzen mit dem Sickerwasser aus Reiskirchen der **Versuchsreihe 25 °C** (Abbildung 23) lagen die Konzentrationen von NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N und PO<sub>4</sub>-P unterhalb der Nachweisgrenze. Die Messungen von NH<sub>4</sub>-N und NO<sub>2</sub>-N ergaben auch am Ende des Versuches keine mess- bzw. nachweisbaren Konzentrationen.

Der NO<sub>3</sub>-N konnte reduziert werden.

Das PO<sub>4</sub>-P war im Rohsickerwasser nicht messbar, jedoch konnte eine geringe Konzentration gegen Ende des Versuches in beiden Ansätzen gemessen werden.

Auch die Kaliumkonzentration lag am Ende von beiden Versuchen höher, als es im Rohsickerwasser am Anfang des Versuches der Fall war.

### Reiskirchen 25 °C

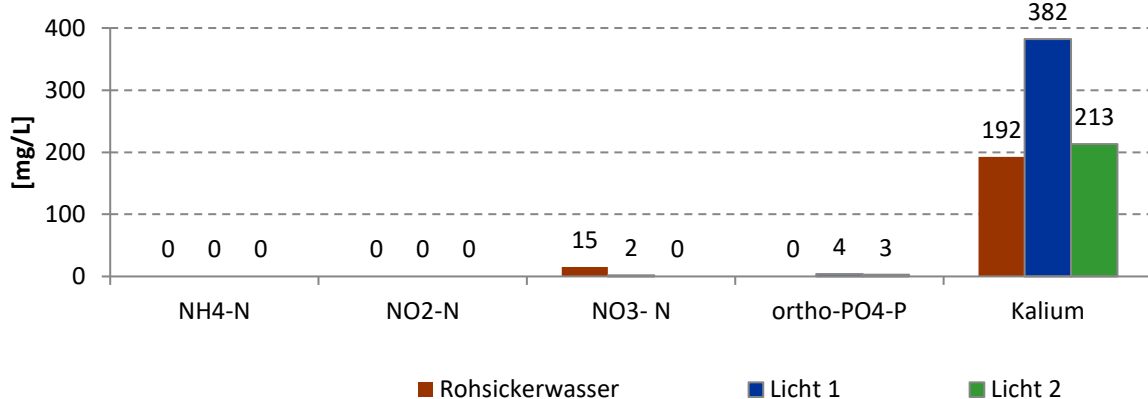


Abbildung 23: Analyse verschiedener Wasserparameter der Versuchsansätze der Sickerwasser Reiskirchen bei 25 °C mit einfacher und doppelter Beleuchtung

In Abbildung 24 sind die Ergebnisse der Wasseranalyse für die **Versuchsreihe 30 °C** des Sickerwassers der Deponie Reiskirchen. In dem Sickerwasser konnte im Rohsickerwasser kein NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N und PO<sub>4</sub>-

P gemessen werden. Auch am Ende des Versuches lagen diese Parameter in beiden Ansätzen unter dem Messbereich.

NO<sub>3</sub>-N konnte im Vergleich zum Rohsickerwasser in beiden Ansätzen reduziert werden.

Auch die Kaliumkonzentration konnte im Ansatz mit einfacher Beleuchtung halbiert und im Ansatz mit doppelter Beleuchtung stark reduziert werden.

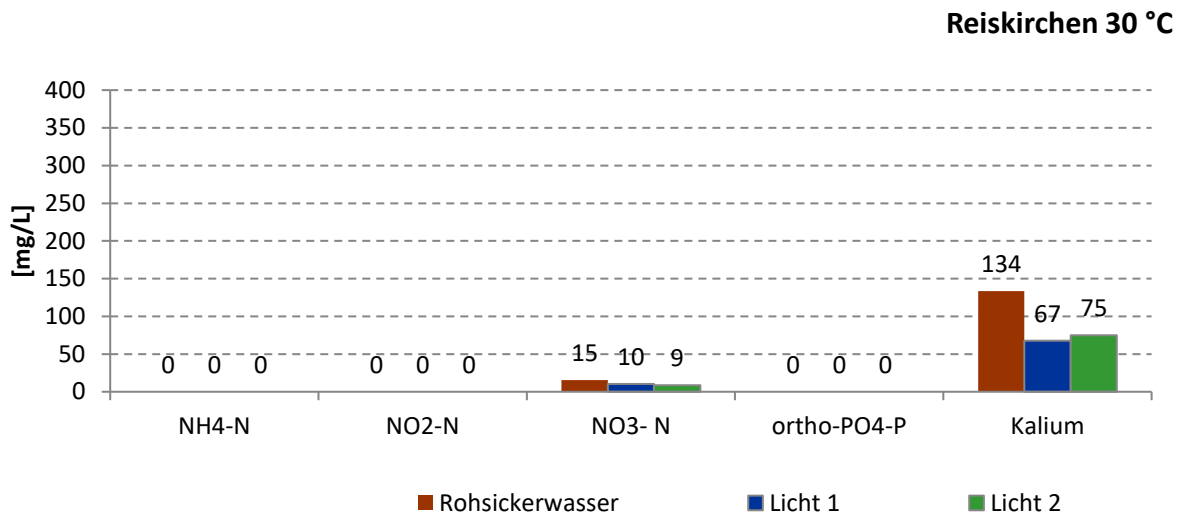


Abbildung 24: Analyse verschiedener Wasserparameter der Versuchsansätze der Sickerwasser Reiskirchen bei 30 °C mit einfacher und doppelter Beleuchtung

#### Sickerwasser der Deponie Aßlar

Der NH<sub>4</sub>-N und NO<sub>2</sub>-N im Sickerwasser Aßlar konnte in der **Versuchsreihe 18 °C** in beiden Lichtansätzen vollständig reduziert werden (Abbildung 25).

Der NO<sub>3</sub>-N war in den Ansätzen mit einfacher Beleuchtung - im Vergleich zum Rohsickerwasser - erhöht und in den Ansätzen mit doppelter Beleuchtung blieb er auf demselben Niveau.

Das PO<sub>4</sub>-P konnte in beiden Ansätzen mindestens halbiert werden.

Auch die Kaliumkonzentration wurde im Vergleich zum Rohsickerwasser reduziert.

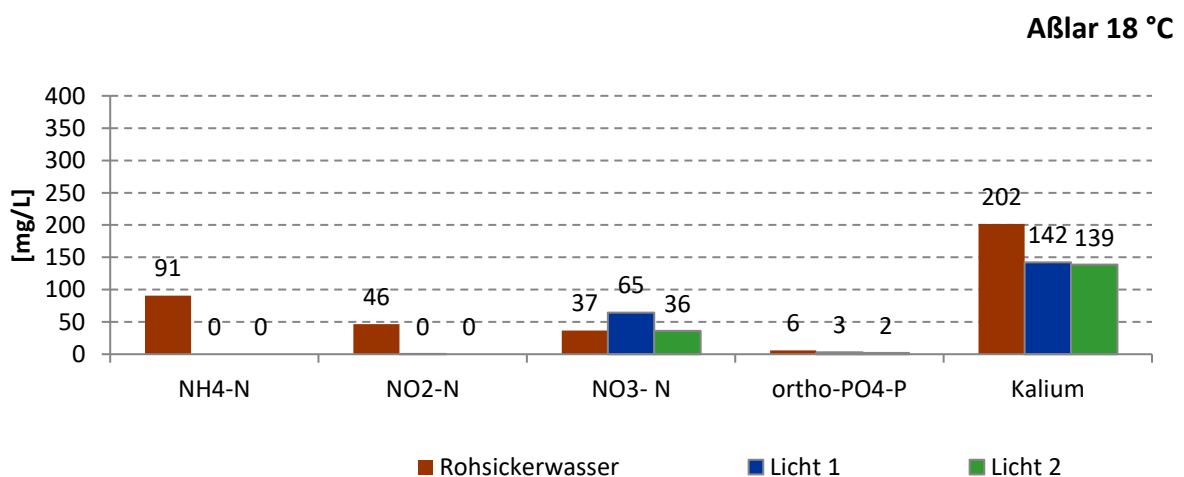


Abbildung 25: Analyse verschiedener Wasserparameter der Versuchsansätze der Sickerwasser Aßlar bei 18 °C mit einfacher und doppelter Beleuchtung

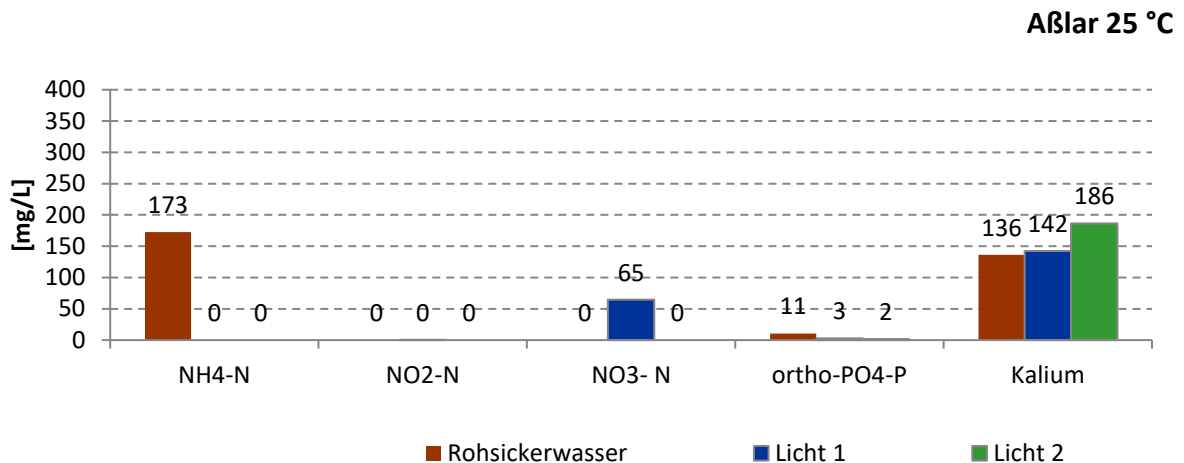
In der **Versuchsreihe 25 °C** des Sickerwassers der Deponie Aßlar (Abbildung 26) konnte  $\text{NH}_4\text{-N}$  vollständig reduziert werden.

$\text{NO}_2\text{-N}$  war am Anfang und am Ende es Versuches jeweils unterhalb des Messbereiches.

$\text{NO}_3\text{-N}$  war im Rohsickerwasser nicht messbar, ebenso im Ansatz bei der doppelten Beleuchtung. Im Ansatz mit einfacher Beleuchtung konnte eine erhöhte  $\text{NO}_3\text{-N}$ -Konzentration gemessen werden.

Das  $\text{PO}_4\text{-P}$  konnte ebenso in beiden Versuchsansätzen stark reduziert werden.

Die Kaliumkonzentration war am Ende des Versuches in beiden Versuchsansätzen höher konzentriert als im Rohsickerwasser.



**Abbildung 26: Analyse verschiedener Wasserparameter der Versuchsansätze der Sickerwasser Aßlar bei 25 °C mit einfacher und doppelter Beleuchtung**

Die Wasseranalyse für das Sickerwasser der Deponie Aßlar der **Versuchsreihe 30 °C** (Abbildung 27) ergab eine vollständige Reduktion von  $\text{NH}_4\text{-N}$  und  $\text{PO}_4\text{-P}$ .  $\text{NO}_2\text{-N}$  konnte stark reduziert werden.

$\text{NO}_3\text{-N}$  verblieb in den Versuchsansätzen im Vergleich zum Rohsickerwasser auf einem ähnlichen Niveau. Im Ansatz mit einfacher Beleuchtung lag der Wert bei 3 mg/L über dem ermittelten Wert, im Ansatz mit doppelter Beleuchtung lag der Wert 2 mg/L unterhalb des ermittelten Wertes des Rohsickerwasser. Die Kaliumkonzentration konnte in beiden Ansätzen um mehr als 100 mg/L reduziert werden.

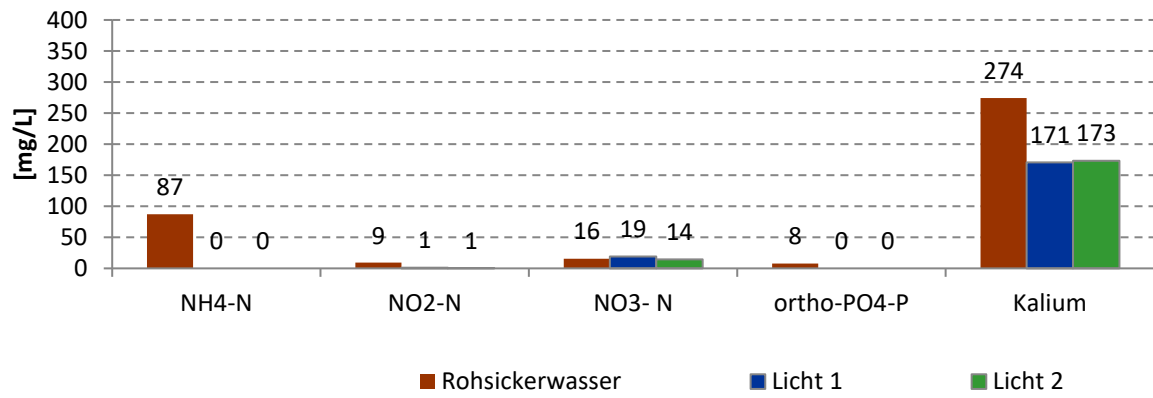


Abbildung 27: Analyse verschiedener Wasserparameter der Versuchsansätze der Sickerwasser Aßlar bei 30 °C mit einfacher und doppelter Beleuchtung

## 2.3. Biomassebildung unter variierenden Kultivierungsbedingungen

In diesem Arbeitspaket wurden verschiedene Kultivierungsarten auf ihr Skalierungspotential hin überprüft. Im „Batch-Experiment“ sollte zunächst die Auswirkung des Wasserstandes auf die Kultivierbarkeit im IBC – Maßstab untersucht werden. Hier war selbst beim niedrigsten Wasserstand von 10 cm (120 Liter) bei der gegebenen Beleuchtungsintensität der LED-Lampen (ca.  $320 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ) auf einer Fläche von ca.  $0,5 \text{ m}^2$ ) kaum Wachstum erkennbar. Als Konsequenz daraus wurde der Versuchsaufbau im „Fed-Batch-Raceway-Experiment“ dahingehend geändert, dass Trennwände in den IBC eingezogen wurden, um die beobachtete Ablagerung von Feststoffen am Boden der Behälter zu verringern. Außerdem wurde die Lichtintensität verdoppelt. Danach konnten Algenwachstum und auch eine Verringerung der Ammoniumkonzentrationen nachgewiesen werden.

Im Vergleich zum vorher beschriebenen Versuchsaufbau wurde im „Biofilm-Experiment“ eine membranbasierte Kultivierung getestet. Dadurch sollte in erster Linie eine Verbesserung der Lichtverfügbarkeit für die Algen erzielt werden. Zunächst wurde der Versuchsaufbau dabei in einem Vorversuch in 20 L Becken untersucht. Danach wurde der Versuch erneut in den 120 L – IBC – Maßstab übertragen. Als Kultivierungsflächen wurden aufschwimmende Filtermatten verwendet. Nach 15 tägiger Kultivierungszeit konnten auf Quadratmeter umgerechnet etwa  $135,4 \text{ g Biomasse pro m}^2$  in der inokulierten Kontrollgruppe (A) und  $88,7 \text{ g Biomasse pro m}^2$  in der nicht inokulierten Kontrollgruppe (B) von den Membranen geerntet werden. Diese Werte sind bereits um die Biomassezunahme ohne phototrophes Wachstum (Kontrollgruppe C) bereinigt. Es konnte demonstriert werden, dass sich das Algenwachstum auch positiv auf den Abbau der abwasserrelevanten Inhaltsstoffe Ammonium und ortho-Phosphat auswirkte. Im Folgenden werden die Versuche detailliert vorgestellt.

### IBC Suspensionskultur im Batch

In dieser Versuchsreihe sollte die Upscaling-Fähigkeit der Algenkultivierung speziell hinsichtlich des Wasserstandes der Deponiesickerwässer untersucht werden.

### Wasserparameter

Die Wasserparameter wurden jeden Morgen in allen Kulturen gemessen. Die Temperatur lag innerhalb der 23 Versuchstage (06.07.2020 bis 28.07.2020) zwischen  $23,9$  und  $25,9 \text{ }^\circ\text{C}$ . Der pH-Wert konnte mit Hilfe der  $\text{CO}_2$ /Luft-Mischbegasung bei 6 - 7 gehalten werden, und die Sauerstoffkonzentration lag während des gesamten Kultivierungszeitraums zwischen 7 und  $9,5 \text{ mg/L}$ . Die gemessene Salinität nahm während des 23-tägigen Versuchszeitraums in allen Kulturen von etwa 5,4 auf 4,3 ab.

### Wachstumsraten

Der Verlauf der Wachstumsraten ist in Abbildung 28 dargestellt. Nach der Inokulation mit dem standortangepassten Mikroalgen-Bakterien-Konsortium an Tag 1 nahm die Algenkonzentration in allen Kulturen stark ab. Nur in der „inokulierten Kultur 1“ konnte nach 9 Tagen eine geringe Zunahme beobachtet werden. Bis zum letzten Versuchstag (Tag 22) konnten jedoch keine Zunahme der Algenkonzentrationen über die Inokulationskonzentration hinaus nachgewiesen werden. Es wurde jedoch beobachtet, dass sich ein Teil der Algenbiomasse der inokulierten Kultur 1 im Strömungsschatten am Boden des IBC's sammelte. In der „inokulierten Kultur 2“ konnten auch im Sediment nur geringe Mengen an Algenbiomasse gefunden werden. Es war nicht möglich, diese Algenkonzentration vom restlichen Sediment zu trennen, um sie zu quantifizieren.



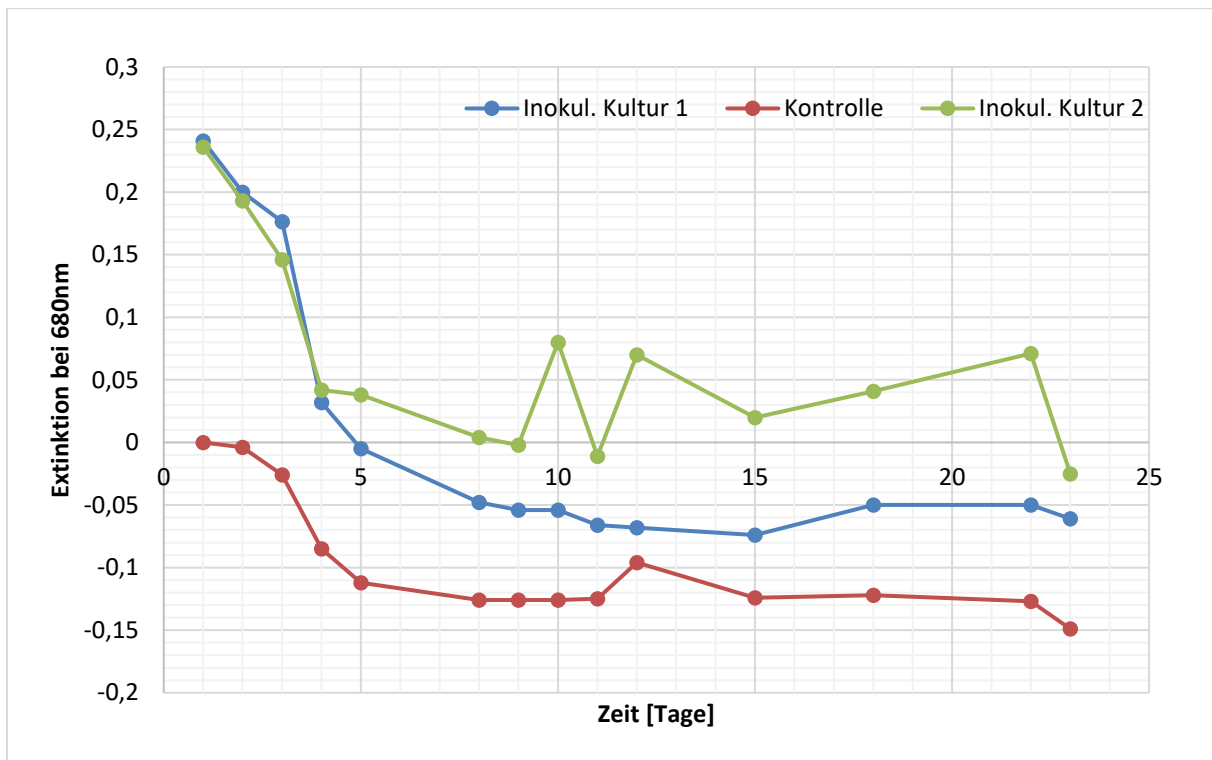


Abbildung 28: Wachstumsverlauf im Batch-Experiment

Aufgrund der schlechten Wachstumsraten beim niedrigsten möglichen Wasserstand von 10 cm, wurden keine höheren Wasserstände mehr untersucht und der Versuch an diesem Punkt abgebrochen. Es wurde stattdessen mit dem Folgeexperiment „IBC Suspensionskultur im Fed-Batch-Raceway“ fortgefahren, um keine weitere Algenbiomasse, Ressourcen und Zeit zu verlieren.

### IBC Suspensionskultur im Fed-Batch-Raceway

#### Wasserparameter

Die Wasserparameter wurden jeden Morgen in allen Kulturen gemessen: Die Temperatur lag innerhalb der 22 Versuchstage zwischen 23,5 und 26,3 °C. Der pH-Wert konnte mit Hilfe der CO<sub>2</sub>/Luft-Mischbegasung bei ca. 6 - 7 gehalten werden. Die Sauerstoffkonzentration lag während des gesamten Kultivierungszeitraums zwischen 8,1 und 10,0 mg/L. Die gemessene Salinität nahm während des 23-tägigen Versuchszeitraums von ca. 4,9 auf 4,1 in allen Kulturen ab.

### Wachstumsraten und Verlauf der Konzentrationen abwasserrelevanter Inhaltsstoffe

In diesem Experiment konnte zwischen Tag 1 und Tag 9 eine Zunahme der Mikroalgenkonzentration nachgewiesen werden. Die maximale Algenkonzentration von etwa 1,0 g/L (OD von 0,67) wurde nach 9 Tagen erreicht. An Tag 9 und Tag 12 wurde Sickerwasser nachgefüllt, was deutlich zu einer Abnahme der Mikroalgenkonzentration um ca. 60% führte und bis zum Ende des Versuchs an Tag 22 anhielt. Dem Verlauf der Algenkonzentration in Abbildung 29 sind die Konzentrationen der abwasserrelevanten Inhaltsstoffe Ammonium, Nitrit und Nitrat gegenübergestellt. Zu Beginn des Versuchs ist ein deutlicher Anstieg der Nitritstickstoffkonzentration bis auf etwa 340 mg/L nachweisbar. Außerdem nimmt gleichzeitig auch die Nitratkonzentration zu und stagniert etwa ab Tag 9 bei 50 mg/L. Die Ammoniumkonzentration fällt von anfänglich ca. 560 mg/L bis zum Tag 9 auf etwa 110 mg/L rapide ab, steigt jedoch nach der Sickerwasserzugabe erneut an, um dann wieder zu sinken.

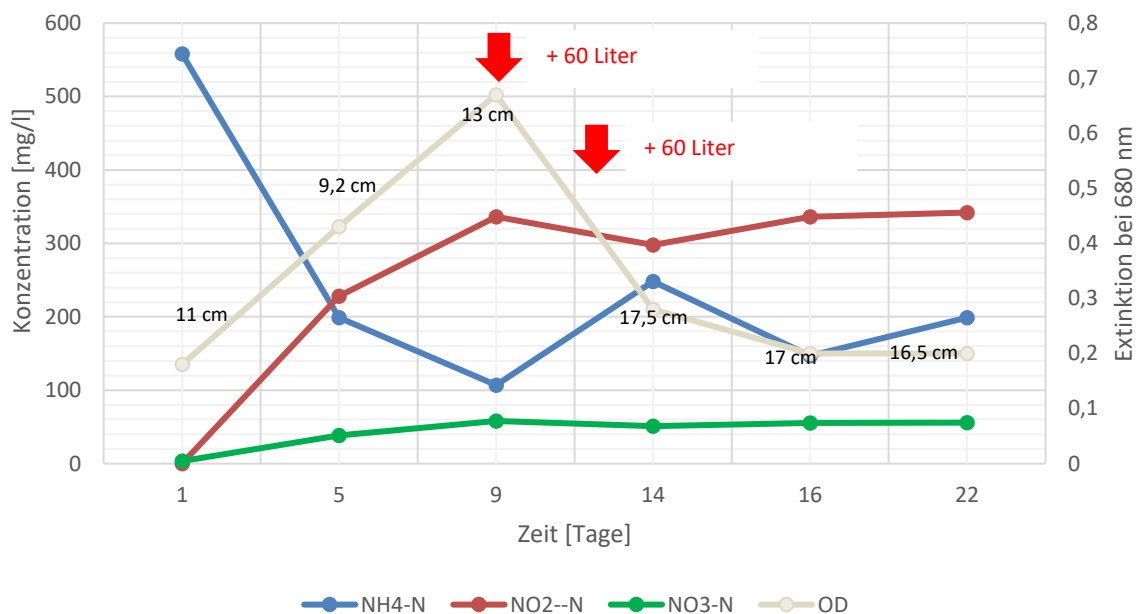


Abbildung 29: Algenwachstumsverlauf und Konzentrationen abwasserrelevanter Inhaltsstoffe im Fed-Batch-Raceway-Experiment

### Biofilm-basierte Kultivierung (Vorversuch im 17 L Maßstab)

#### Wasserparameter

Die Temperatur lag innerhalb der 22 Versuchstage zwischen 24,3 und 26,9 °C. Der pH-Wert fiel während der Kultivierung von 7,9 auf 6,6 ab, und die Sauerstoffkonzentration in den Suspensionen lag während des gesamten Kultivierungszeitraums zwischen 4,8 und 8,3 mg/L. Die gemessene Salinität nahm in allen Kulturen während des 23-tägigen Versuchszeitraums von etwa 5,2 auf 4,2 ab.

### Wachstumsraten

Nach der 9-tägigen Kultivierungszeit, wurden die Algen von den ca. 0,01 m<sup>2</sup> Membranen geerntet und getrocknet. Im Durchschnitt wurden 0,7 ± 0,4 g Algenbiomasse absolut bzw. 70 g pro m<sup>2</sup> erhalten.

### Verlauf der Ammoniumkonzentrationen

Die Ammoniumkonzentration in den Suspensionen wurde über einen Zeitraum von 9 Tagen gemessen. Sie sank innerhalb dieses Zeitraumes um ca. 70% von 612 mg/ L auf 209 mg Ammonium pro Liter (siehe Abbildung 30).

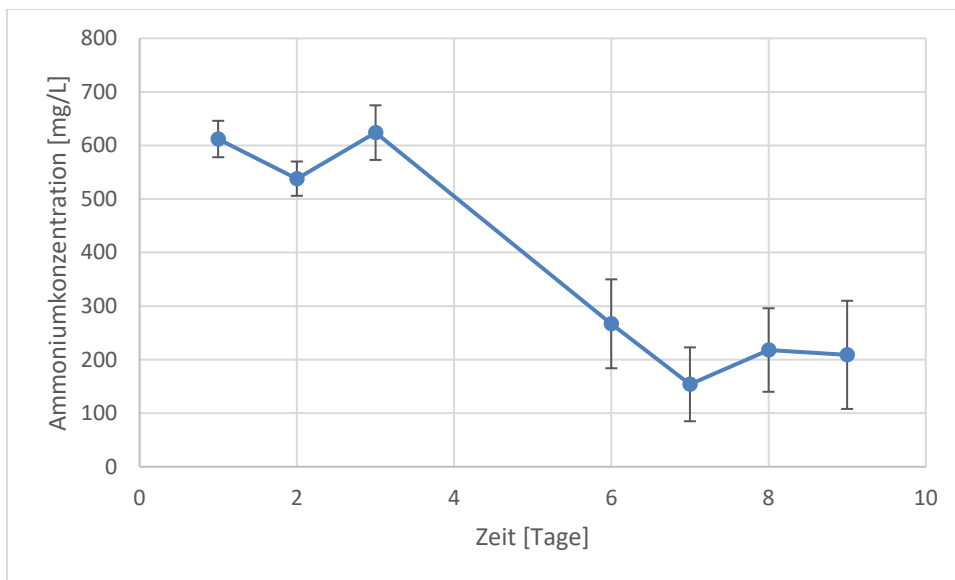


Abbildung 30: Verlauf der Ammoniumkonzentrationen während der Biofilm-basierten Kultivierung (Vorversuch im 17 L Maßstab)

### Biofilm-basierte Kultivierung (Versuch im IBC - Maßstab)

#### Wasserparameter

Die Wasserparameter wurden jeden Morgen in allen Kulturen gemessen: Die Temperatur konnte innerhalb der 15 Versuchstage zwischen 22,4 und 24,4 °C gehalten werden. Der pH-Wert wurde mit Hilfe der CO<sub>2</sub>/Luft-Mischbegasung auf 6 bis 7 eingestellt. An Tag 10 fiel die Begasung aus. Hier stieg der pH-Wert in Kultur A auf 8,07, in Kultur B auf 8,06 und in Kultur C auf 8,16.

Die Sauerstoffkonzentration lag in den Suspensionen während des gesamten Kultivierungszeitraumes zwischen 4,1 und 8,8 mg/L. Die gemessene Salinität nahm in allen Kulturen während des 23-tägigen Versuchszeitraumes von 7,1 auf 4,9 ab.

#### Wachstumsraten

Der Ertrag als Durchschnitt in den verschiedenen Kontrollgruppen ist in Abbildung 31 dargestellt. Zur Ermittlung des Algenbiomasseertrages in den Gruppen A und B wurde die Differenz zur Gruppe C

gebildet. Demnach ergibt sich rechnerisch ein Ertrag von  $135,4 \text{ g/m}^2$  in der inokulierten Kontrollgruppe (A) und von  $88,7 \text{ g/m}^2$  in der nicht inokulierten Kontrollgruppe (B).

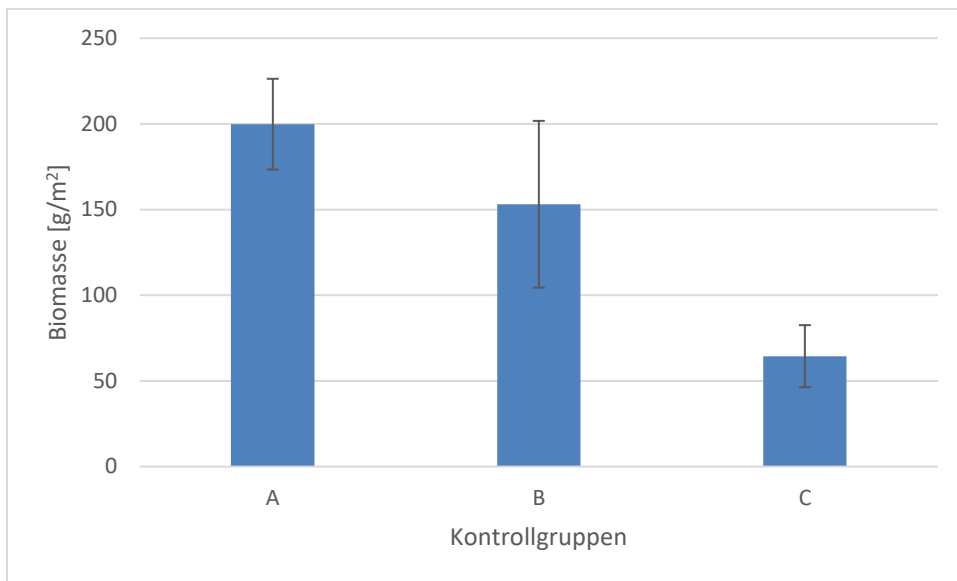


Abbildung 31: Biomasserträge mit Standardabweichung nach 15-tägiger Kultivierung in den Kontrollgruppen: A) Inokulierte Kultur; B) Kontrolle 1: Nicht inokulierte Kultur; C) Kontrolle 2: Nicht inokulierte, abgedunkelte Kultur

Es wurden Proben von den Biofilmen auf den Membranen abgestrichen und mikroskopiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 32 dargestellt. In den zufällig entnommenen Stichproben aus den Biofilmen der Membranen in den Kontrollgruppen A, B und C wurden unterschiedliche Algen beobachtet. Während in der inokulierten Kultur (A) überwiegend *Chlorella sp.* und nicht näher identifizierte, relativ kurze, stäbchenförmige Mikroalgen erkannt wurden, wurden in der natürlich gewachsenen, nicht inokulierten Kontrollgruppe (B) überwiegend lange Ketten aus stäbchenförmigen Mikroalgen gefunden. Bisher ist noch nicht klar, um welche Gattungen und Arten es sich hierbei handelt. In der nicht inokulierten, abgedunkelten Kontrollgruppe (C) wurden keine Mikroalgenzellen identifiziert. Bei 400-facher Vergrößerung wurden ausschließlich kleine, dunkle Punkte, aber keine Mikroalgen erkannt.

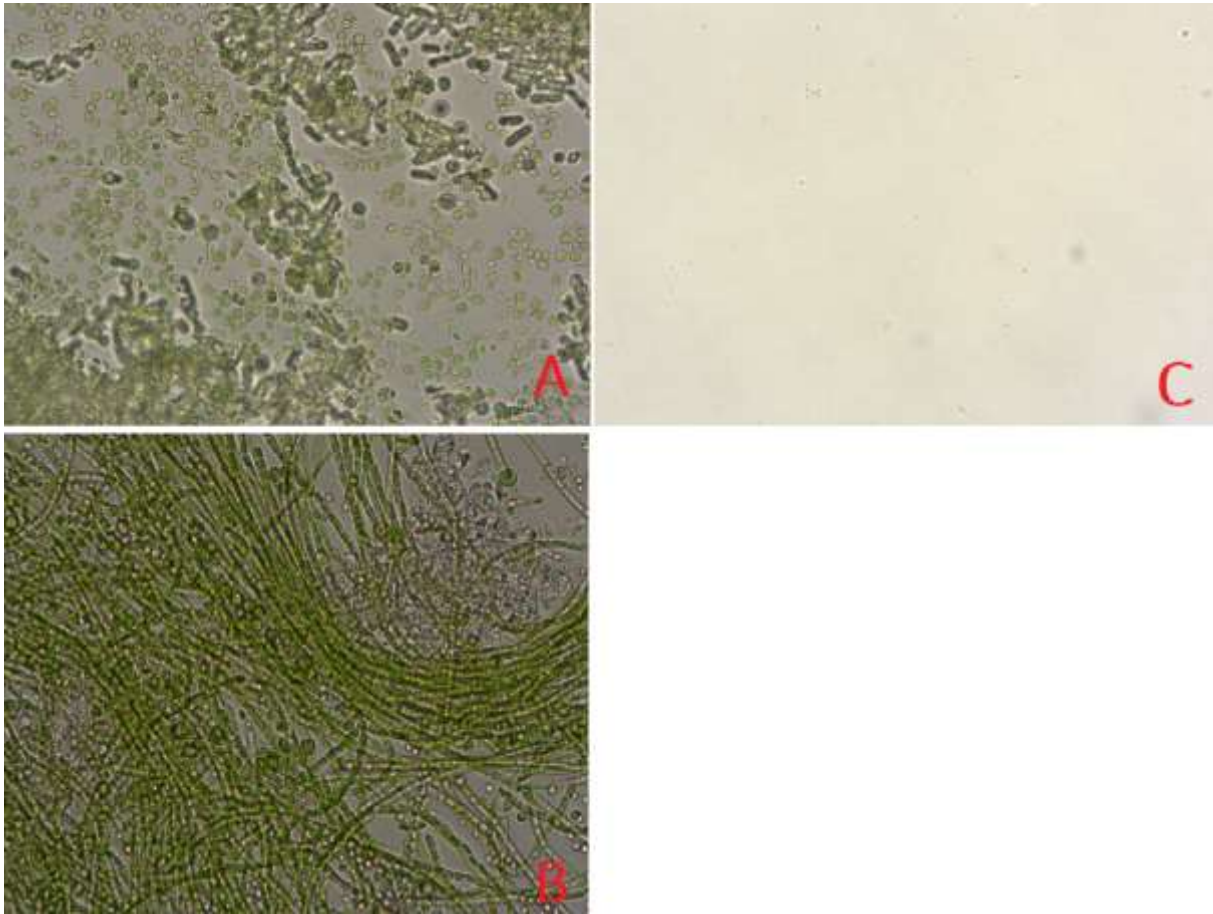


Abbildung 32: Biofilme bei 400-facher Vergrößerung nach 15-tägiger Kultivierung in den Kontrollgruppen: A) Inokulierte Kultur; B) Kontrolle 1: Nicht inokulierte Kultur; C) Kontrolle 2: Nicht inokulierte, abgedunkelte Kultur

Der Feststoffgehalt konnte nicht bestimmt werden, da die Mikroalgenbiomasse nicht nur an der Oberfläche, sondern auch zu einem Teil innerhalb des Membrankörpers gewachsen ist. Es war deshalb nicht möglich, Biomasse und Membranen in einem befriedigenden Maße voneinander zu trennen, um das Nassgewicht der reinen Biomasse zu bestimmen.

#### Verlauf der Konzentrationen abwasserrelevanter Inhaltsstoffe

Der Verlauf der Ammonium-N, Nitrit-N, Nitrat-N und der ortho-Phosphat-P Konzentrationen sowie des CSB-Wertes sind in

Abbildung 33 dargestellt. Die Konzentrationen an Ammonium und Phosphat nahmen im Durchschnitt in allen Kontrollgruppen ab, während die Nitrit- und Nitrat-Konzentrationen sowie der CSB-Wert in allen Kontrollgruppen zunahmen.

In den Kulturen mit Algenwachstum, A und B, nahm die Ammonium-N- und Phosphat-P-Konzentration wesentlich stärker ab als in der Kontrollgruppe C ohne Algenwachstum. Zu Beginn lag die Ammoniumkonzentration in den Kulturen etwa bei 220 mg/L. Nach 15 tägiger Kultivierungszeit konnte diese in den Kulturen mit Algenwachstum, A und B, auf ca. 90 bzw. 60 mg/L reduziert werden. In der Kontrollgruppe C, ohne phototrophes Wachstum, sank die Ammoniumkonzentration lediglich auf 120 mg/L. Auch die gemessenen Konzentrationsverläufe von ortho-Phosphat-P verhielten sich unterschiedlich zwischen den 3 Kontrollgruppen. Die Anfangskonzentration lag in allen Kulturen bei

0,8 mg/L. In der inokulierten Kultur (A) sank diese innerhalb des 15-tägigen Versuchszeitraumes annähernd linear auf ca. 0,1 mg/L ab. Der Verlauf in der Kontrollgruppe ohne Inokulation (B) zeigte zu Beginn eine Latenz hinsichtlich der Konzentrationsabnahme. Erst nach dem 2. Messpunkt an Tag 8 fiel die Konzentration auf ca. 0,3 mg/L. In der Kontrollgruppe ohne Beleuchtung (C), sank die Phosphat-P-Konzentration innerhalb des 15-tägigen Versuchs nur geringfügig auf ca. 0,7 mg/L.

Die gemessenen Werte für die Nitrit-N, Nitrat-N Konzentrationen sowie die Belastung mit organischen Verbindungen (CSB) nahm in allen Kulturen im Durchschnitt zu. Zwischen Tag 1 und 8 stagnierte der CSB-Wert in allen Kulturen bei etwa 500 – 600 mg/L. Erst gegen Ende des Versuches nahm der Wert in allen Kulturen zu. Die stärkste Zunahme von etwa 30% wurde in der Kontrollgruppe B gemessen. In den Kontrollgruppen A und C stieg der Wert nur um ca. 10 bzw. 20% an.

Die Nitrit- und Nitratkonzentrationen stiegen in den Kontrollkulturen mit Algenwachstum (A und B) wesentlich stärker an als in der abgedunkelten Algenkultur ohne phototrophes Wachstum (C). Die höchste Zunahme wurde in der Kontrollkultur ohne Inokulation (B) verzeichnet. Hier stiegen die Konzentrationen von Nitrit- und Nitrat-N im 15-tägigen Versuchszeitraum von einem niedrigen, einstelligen Bereich auf ca. 37- bzw. 145 mg/L an. In den Kontrollgruppen B und C war die Zunahme jedoch um ca. 15- bzw. 30% niedriger.

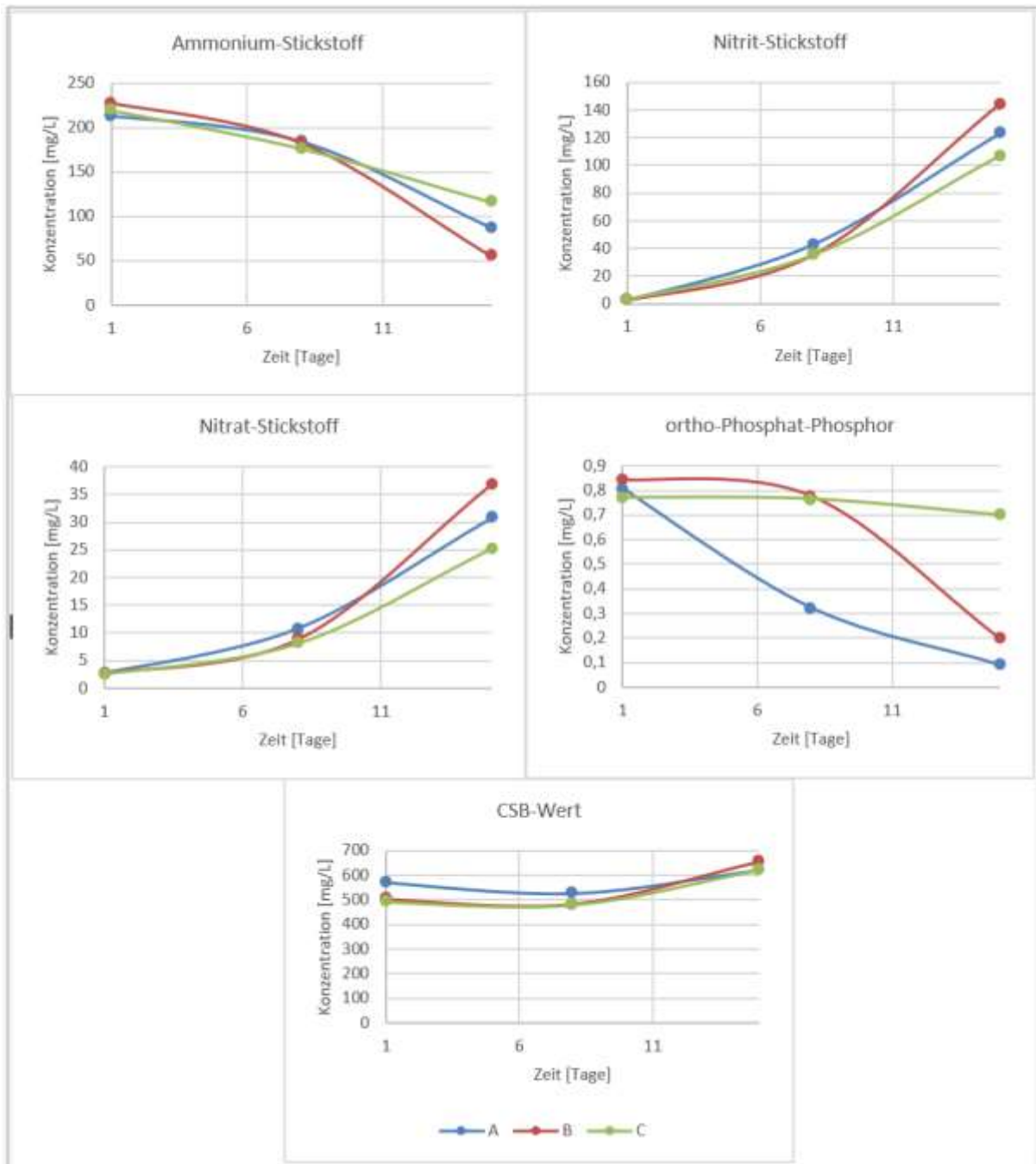


Abbildung 33: Konzentrationsverlauf verschiedener abwasserrelevanter Inhaltsstoffe während des 15-tägigen Kultivierungsverlaufs im Versuch „Biofilm-basierte Kultivierung (Versuch im IBC - Maßstab)“ in den Kontrollgruppen: A) Inokulierte Kultur; B) Kontrolle 1: Nicht inokulierte Kultur; C) Kontrolle 2: Nicht inokulierte, abgedunkelte Kultur

## 2.4. Diskussion

In den Arbeitspaketen 1.1 bis 1.4 wurden die unterschiedlichen Sickerwässer mit verschiedenen Methoden hinsichtlich Ihrer mikrobiotischen Zusammensetzung untersucht. Die Gattung *Chlorella* wurde in allen Sickerwässern als dominierende Algengattung vorgefunden (AP 1.1 – 1.4). Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, da sie als eine der wenigen Mikroalgen in derart hochbelasteten Sickerwässern wachsen kann.

In AP 1.5 wurde das standortangepasste Mikroalgen-Bakterien-Konsortium der Deponie Leppe zur Inokulation der vier verschiedenen Sickerwässern verwendet. In allen Sickerwässern konnten wiederholbar gute Wachstumsraten der Algen von bis zu 1,2 g pro Liter und Tag erreicht werden. Die Ergebnisse dieses Arbeitspaketes deuten darauf hin, dass die Kultivierbarkeit von Mikroalgen wesentlich weniger vom Belastungsgrad der Deponiesickerwässer als vielmehr von der Optimierung der Kultivierungsbedingungen sowie der Verwendung standortadaptierter Mikroalgen-Bakterien-Konsortien abhängig ist. Unter diesen Bedingungen konnte eine Toleranz der Algen gegenüber hohen Belastungen mit dem wachstumshemmenden Stoff Ammonium von bis zu maximal 934 mg/L nachgewiesen werden.

In AP 2.1 wurden die Wachstumsparameter pH-Wert, Lichtintensität und Temperatur auf das fotosynthetische Wachstum der Algen untersucht. Die höchsten Wachstumsraten wurden bei der maximalen Lichtintensität von durchschnittlich 1970 Lux, einer Temperatur von unter 25°C und einem pH-Wert unter 9 erzielt. Die Wachstumseinbußen bei höheren Temperaturen und höheren pH-Werten werden insbesondere auf einen toxischen Effekt von Ammoniak sowie eine geringere Verfügbarkeit von CO<sub>2</sub> zurückgeführt.

In AP 2.2 wurden die Abbauraten abwasserrelevanter Inhaltsstoffe durch die Inokulation mit dem standortangepassten Mikroalgen-Bakterien Konsortium untersucht. Der Abbau von Phosphat, Nitrit, Nitrat und organischen Verbindungen (CSB) nach 15-tägiger Kultivierungszeit war statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber den Kontrollkulturen ohne Inokulation. Es konnte allerdings keine Ammoniumreduktion durch die Algen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist ungewöhnlich, da Ammonium in einer Vielzahl anderer Studien als primäre Stickstoffquelle von *Chlorella* sp. beschrieben wurde. Stattdessen wird angenommen, dass Nitrit und Nitrat als primäre Stickstoffquelle dienen.

In AP 2.3 wurden zuletzt verschiedene Kultivierungsarten auf Ihr Skalierungspotential hin überprüft. Es wird angenommen, dass die suspensions-basierte Kultivierung in einem Batchansatz durch die hohe Trübung der verwendeten Sickerwässer bzw. die eingeschränkte Lichtverfügbarkeit der Algenzellen limitiert wurde. Erst bei starker Durchmischung in einem Fed-Batch-Raceway-Aufbau und einer Verdopplung der Lichtintensität konnten Algenkonzentrationen von maximal etwa 1 g/L gemessen werden. Zudem wurden Versuche mit Membran-/ Biofilm-basierten Kulturen durchgeführt. Dabei konnte im Gegensatz zu den Suspensionskulturen auch ohne Verdopplung der Lichtintensität und ohne Erhöhung der Durchmischung der Kulturen Algenwachstum nachgewiesen werden. Nach 15 tägiger Kultivierungszeit konnten umgerechnet bis zu 135,4 g Biomasse pro m<sup>2</sup> von den Membranen geerntet werden. Diese Erntemenge ist im Vergleich zu anderen Studien recht hoch und wurde auf die bessere Lichtausbeute der an der Oberfläche schwimmenden Membranen sowie auf synergetische Effekte in den Biofilmen zurückgeführt.

In den Biofilmen wurden neue Mikroalgengattungen entdeckt, die bisher in den rein suspensionsbasierten Kulturen noch nicht gesehen wurden. Nach der 15-tägigen membranbasierten Kultivierung im 120 L – IBC – Maßstab, wurde in den Kulturen mit Algenwachstum eine Reduktion der



Ammonium- und ortho-Phosphat Konzentration gegenüber den Kulturen ohne Algenwachstum nachgewiesen. Der Abbau von Ammonium in den membranbasierten Systemen steht im Widerspruch zum fehlenden Abbau in den suspensionsbasierten Kulturen aus AP 2.2. Es wird vermutet, dass diese Veränderung insbesondere auf die veränderte Mikrobiözönose der Biofilme zurückzuführen ist. Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Arbeitspakete nochmals detailliert diskutiert.

#### AP 1.1 – 1.4: Isolierung und Charakterisierung der standortangepassten Mikroalgen mit verschiedenen Methoden (Universität Gießen)

Isolate aus den vier unterschiedlichen Deponiesickerwässern zeigen ausschließlich Mikroalgen der Gattung *Chlorella* als dominante Algenspezies (AP 1). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass diese Algengattung eine besonders gute Anpassung an Deponiesickerwasser besitzt und eine hohe Toleranz gegenüber hohen Nährstoffgehalten und hohen Eintrübungen des Wassers aufweist. Bisherige lichtmikroskopische Beobachtungen zeigen keine morphologischen Unterschiede zwischen den Algenkulturen. Auch in anderen Studien, konnte die Gattung *Chlorella* sp. in Deponiesickerwässern identifiziert werden (Edmundson and Wilkie, 2013; Nordin, Yusof and Samsudin, 2017).

Es wurden Versuche zur methodischen Etablierung einer Charakterisierung der Mikrobiözösen auf genetischer Ebene durchgeführt. Ein erster Versuch zeigte, dass diese Methode durchführbar ist. In der zweiten Projektphase soll deshalb die Charakterisierung des standortangepassten Mikroalgen-Bakterien-Konsortiums durch genetische Untersuchungen fortgesetzt werden.

#### AP 1.5: Kultivierung der angepassten Algen in verschiedenen Deponiesickerwässern (TH-Köln)

Im AP 1.5 konnte Wachstum von Mikroalgen in allen inokulierten und uninokulierten Kulturen aller Sickerwässer nachgewiesen werden. Wie in Tabelle 16 auf Seite 75 gezeigt, variierten die verwendeten Sickerwässer dabei wesentlich hinsichtlich des Belastungsgrades mit organischen Verbindungen, der Trübung sowie der Konzentrationen an Ammonium und ortho-Phosphat. Gleichzeitig wurde auch Algenwachstum in den Kontrollkulturen, ohne Algeninokulation, nachgewiesen, was zum einen auf Kontaminationen zurückzuführen sein könnte, da Mikroalgen ebenfalls in den Begasungsschläuchen gewachsen sind. In Folgestudien sollen die Begasungsschläuche nach jedem Versuch getauscht werden. Ein weiterer möglicher Grund für das Algenwachstum in den Kontrollkulturen ist, dass in allen verwendeten rohen Sickerwässern Mikroalgen der Gattung *Chlorella* sp. nachgewiesen werden konnten (siehe AP 1.1 „Mikroskopische Charakterisierung“). Trotzdem wurde diese Art der Kontrollkultur verwendet, da andere Strategien, wie die Sterilisation oder Lichtlimitierung der Kontrollkultur, die Vergleichbarkeit zu den inokulierten Kulturen wesentlich verringert hätte. Das Wachstum in den Kontrollkulturen ohne Inokulation ist jedoch ein interessantes Ergebnis, da es zeigt, dass unter den gegebenen Kultivierungsbedingungen eine aktive Inokulation bzw. eine hohe Inokulationsmenge nicht obligatorisch für das Anwachsen der Mikroalgen ist.

In den inokulierten Kulturen führten höhere Belastungen mit Nährstoffen und organischen Belastungen (CSB) zu einer höheren akkumulierten Biomasseproduktion über den 15-tägigen Versuchszeitraum hinaus. Insbesondere  $\text{PO}_4^{3-}$  könnte ein limitierender Faktor sein, da es in allen Ansätzen völlig aufgebraucht wurde und in allen vier verwendeten Sickerwässern höhere Phosphatkonzentrationen immer auch zu höheren End-Biomassekonzentrationen innerhalb des 15-tägigen Versuchszeitraumes führten (siehe Abbildung 34).

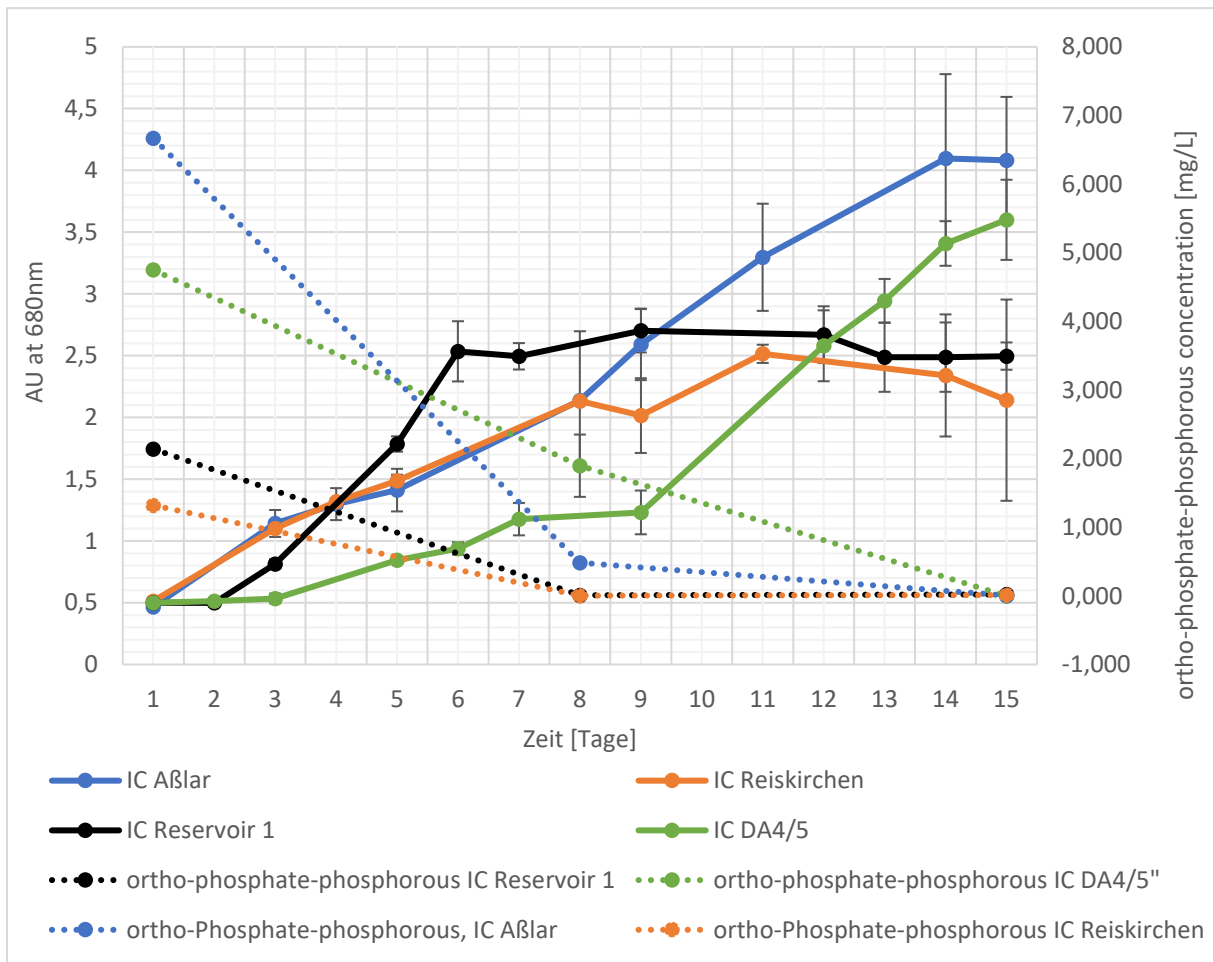


Abbildung 34: Korrelation zwischen der Wachstumsdynamik und der ortho-phosphat-Phosphor Konzentration in allen innokulierten Kulturen

Die beobachtete Phosphatlimitation stimmt mit den Ergebnissen anderer Studien zur Mikroalgenkultivierung in Deponiesickerwasser überein, da die Phosphatkonzentration in Deponiesickerwässern typischerweise gering ist (Paskuliakova, Tonry and Touzet, 2016).

Gleichzeitig sind Deponiesickerwässer in der Regel reich an Ammonium- und Ammoniak-Stickstoff (TAN) (Mustafa, Phang and Chu, 2012; Edmundson and Wilkie, 2013; Pereira *et al.*, 2016). Obwohl viele Mikroalgen Ammonium als primäre Stickstoffquelle bevorzugen, führen hohe Konzentrationen sowohl an Ammonium als auch an Ammoniak, welches mit Ammonium im Gleichgewicht steht, häufig zu inhibierenden Effekten (Xia and Murphy, 2016). Insbesondere Ammoniak wurde als besonders wachstumsinhibierend für manche Mikroalgenpezies beschrieben. Andere, wie beispielsweise *Clorella sorokiniana* zeigen jedoch keine Inhibierung (Gutierrez *et al.*, 2016). Die Inhibierungsgrenzen für TAN variieren stark in Abhängigkeit vom Ammoniak/Ammonium-Gleichgewicht (abhängig von pH-Wert und der Temperatur) sowie den verwendeten Algenspezies. Im vorliegenden Versuch sind Auswirkungen von Ammoniak auf das Algenwachstum weitestgehend zu vernachlässigen, da der pH-Wert durch die permanente CO<sub>2</sub>-Begasung auf 6,5 bis 7 und die Temperatur auf 22°C eingestellt wurden. Unter diesen Bedingungen wird das NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/NH<sub>3</sub>-Gleichgewicht zu über 99 % auf die Seite des Ammoniums verschoben (siehe auch Formel 1 auf Seite 55). Das Ammonium bleibt in Lösung, gast nicht als Ammoniak aus und bleibt dadurch messbar.

Die Kultivierung von Mikroalgen in Deponiesickerwässern, welche die hohen Ammoniumkonzentrationen des Projektes ERA<sup>3</sup> erreichen, wurde bisher nur in wenigen Studien

untersucht (Lin *et al.*, 2007; Edmundson and Wilkie, 2013). Edmundson und Wilkie stellten bei monoalger Inokulation von reinem Deponiesickerwasser mit einer Ammonium-Stickstoff-Konzentration von 980 mg/L eine maximale Zellkonzentration von etwa  $2,5 \cdot 10^6$  Zellen fest. Bei ERA<sup>3</sup> wurden in den unverdünnten Sickerwässern mit Ammoniumkonzentrationen von bis zu 934 mg/L (DA 4/5, Deponie Leppa) dagegen etwa 150-Mal höhere Zellkonzentrationen von maximal  $400 \cdot 10^6$  Zellen gemessen (siehe auch Abschnitt „ Korrelation der optischen Dichte mit der Trockensubstanz, der Zellzahl und der Menge flüchtiger organischer Bestandteile“ ab Seite 80).

Lin *et al.* stellten bei standortangepassten Mikroalgen der Gattung *Chlorella* fest, dass Ammonium-Stickstoff-Konzentrationen über 135 mg/L zur Wachstumshemmung- und Konzentrationen über 670 mg/L zur Wachstumsinhibierung führen, wobei jedoch das genaue Verhältnis von Ammonium zu Ammoniak nicht exakt berücksichtigt wurde (Lin *et al.*, 2007).

Bei ERA<sup>3</sup> (Phase I) konnte *Chlorella sp.* in einem Konsortium mit anderen Mikroorganismen auch in hochgradig belasteten, unverdünnten Sickerwässern (bis zu 934 mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup> - N pro L) reproduzierbar kultiviert werden. Dabei führten höher belastete Sickerwässer sogar zu höheren Wachstumsraten. Mögliche Gründe dafür sind zum einen eine gewisse Toleranz des Mikroalgen-Bakterien-Konsortiums gegenüber steigenden Ammoniumkonzentration in Kombination mit einer Phosphatlimitierung. Zum anderen könnte der konstant niedrige pH-Wert von 6,5 – 7 mit einer Umgebungstemperatur von 22°C zu der verringerten ammoniakbasierten Toxizität geführt haben (Abeliovich and Azov, 1976). Die allgemein guten Wachstumsraten können aber auch auf die gute CO<sub>2</sub>-Verfügbarkeit zurückgeführt werden, welche durch den neutralen pH-Wert und die permanente CO<sub>2</sub>-Luft-Mischbegasung bedingt sind. Durch den neutralen pH-Wert wird gewährleistet, dass genügend CO<sub>2</sub> zur Verfügung steht, welches passiv in die Zellen der Mikroalgen diffundieren kann. Bei höheren, basischen pH-Werten, setzt sich dieses eher in Carbonat (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) oder Bikarbonat (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) um, das durch aktiven Transport in die Zellen aufgenommen werden muss. Dieser Prozess ist im Vergleich zur passiven Aufnahme energetisch wesentlich ungünstiger und kann sich negativ auf das Wachstum der Mikroalgen auswirken (Abeliovich and Azov, 1976; Sutherland *et al.*, 2015).

Auch die synergistische Wirkung mikrobieller Diversität im standortangepassten Mikroalgen-Bakterien-Konsortium kann eine wichtige Rolle bei der Kultivierbarkeit gespielt haben. Diese wurde bei der Verwendung von Deponiesickerwässern als Algenkultivierungsmedium untersucht (Zhao *et al.*, 2014b; Sniffen, Sales and Olson, 2016; Hernández-García *et al.*, 2019; Tighiri and Erkurt, 2019). Bisher wurden jedoch keine Vergleichsstudien durchgeführt, in denen Mikroalgen-Bakterien-Konsortien direkt mit monoalgalen Systemen verglichen wurden. Ähnliche Studien in anderen Abwässern sind jedoch vielversprechend: Beispielsweise konnten Cho *et al.* zeigen, dass mikrobielle Diversität eine essenzielle Rolle bei der Aufrechterhaltung einer stabilen Biomasseproduktion in HRAP's (High rate algal ponds) zur Aufbereitung kommunaler Abwässer spielt. Dies galt insbesondere bei sich ändernden Umweltbedingungen. Gleichzeitig führte die Inokulation mit selektierten Mikroalgenpezies zu einer verringerten Anpassungsfähigkeit der mikrobiellen Konsortien gegenüber sich ändernden Umweltbedingungen (Cho *et al.*, 2017).

Aufgrund der großen Vielfalt an Parametern, die das Wachstum der Mikroalgen beeinflussen können, ist es jedoch schwierig, verschiedene Studien miteinander zu vergleichen. Die in dem vorliegenden Projekt erzielten maximalen und durchschnittlichen Wachstumsraten waren jedoch wesentlich höher als in anderen, vergleichbaren Studien, welche *Chlorella sp.* oder Mikroalgen-Bakterien-Konsortien mit *Chlorella sp.* als dominierende Gattung und Deponiesickerwasser als Medium verwendeten (Vergleich siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Vergleich wichtiger Wachstumsraten und Parameter in den verschiedenen Sickerwässern von ERA<sup>3</sup> Phase I inkl. eines Vergleichs mit ähnlichen Studien. G(max): Maximale Wachstumsrate innerhalb des Versuchszeitraumes; G(med): Durchschnittliche Wachstumsrate innerhalb des Versuchszeitraumes; BM(max): Maximale Biomasseproduktion während des Kultivierungszeitraumes; C(x): Konzentration der Substanz x im Deponiesickerwasser

	Deponiesickerwässer der vorliegenden Studie				Andere Studien	
	Reservoir 1	DA 4/5	Aßlar	Reiskirchen	(Zhang and Cheng, 2018)	(Tighiri and Erkurt, 2019)
<b>G(max.)</b> [gTS/L/d]	1.2	0.58	0.65	0.37	0.15	0.39
<b>G(med.)</b> [gTS/L/d]	0.16	0.26	0.3	0.13	n.a.	n.a.
<b>BM(max.)</b> [g/L]	3.3	4.1	5.1	3.0	0.66	n.a.
<b>c(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N)</b> [mg/L]	466	908	496	244	135,9	256.9
<b>c(PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P)</b> [mg/L]	2.1	4.44	6.94	1.42	15,3	9.8
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b>	222:1	205:1	72:1	172:1	9:1	26:1
<b>CSB-Wert</b> [mg/L]	789	2042	1046	476	341.5	936.1

Eine vergleichbare Studie zu Phycoremediation in unverdünnten Deponiesickerwässern unter Verwendung einer isolierten, monoalgalen *Chlorella vulgaris* FACHB-31 Kultur wurde von Zhang und Cheng durchgeführt (Zhang and Cheng, 2018). Im Vergleich zu ERA<sup>3</sup> lagen die maximalen Wachstumsraten und die Biomassekonzentrationen jedoch nur bei ca. 50 bzw. 20%. Gleichzeitig enthielt das in dieser Studie verwendete Sickerwasser nur etwa halb so viel Ammonium, aber mehr als zehn Mal so viel Phosphat als beispielsweise das Sickerwasser der Deponie Aßlar (siehe Tabelle 16), welches als limitierender Faktor des Mikroalgenwachstums angenommen wird.

Tighiri und Erkurt verwendeten ein Mikroalgen-Bakterien-Konsortium, welches *Clorophyceae* als dominierende Gattung enthielt, um in einem 18 Tage dauernden Versuch Deponiesickerwasser aufzureinigen (Tighiri and Erkurt, 2019). Hier entsprachen die Ammoniumkonzentrationen in etwa denen der Deponie Aßlar (siehe Tabelle 16), die gemessenen Phosphatkonzentrationen waren aber ebenfalls etwa zehn Mal höher. Die gemessenen Wachstumsraten der Studie ERA<sup>3</sup> waren im Vergleich zur oben genannten Studie von Zhang und Cheng ca. dreimal höher.

Auch wenn es zwischen den Studien eine Vielzahl an unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen und Einflussfaktoren gab, untermauern diese Ergebnisse den ermittelten Befund, dass Mikroalgen-Bakterien-Konsortien im Vergleich zu monoalgalen Systemen zu besseren Wachstumsraten führen können.

Die Ergebnisse des bisher vorliegenden Projektes ERA<sup>3</sup> lassen im Vergleich zu anderen Studien den Schluss zu, dass die Kultivierbarkeit von Mikroalgen wesentlich weniger vom Belastungsgrad der Deponiesickerwässer, als mehr von der Optimierung der Kultivierungsbedingungen und der Verwendung standortadaptierter Mikroalgen-Mikroorganismen-Konsortien abhängt. Diese Toleranz gegenüber unverdünnten, hochbelasteten Deponiesickerwässern ist unserer Meinung nach eine der wichtigsten Voraussetzung dafür, dass die Phycoremediation in einen industriellen Maßstab ökonomisch und ökologisch nachhaltig übertragen werden kann.

### Reproduzierbarkeit der Wachstumsraten

Die in Arbeitspaket 1.5 erzielten Wachstumsraten waren in zwei weiteren Experimenten mit identischen Kultivierungsbedingungen reproduzierbar. Dabei entsprach das Wachstum der Mikroalgen dem typischen Wachstumsverlauf einer photoautotrophen Mikroalgenkultur. Zunächst benötigten die Algen in der Regel eine gewisse Zeit, um sich an die Umgebung zu adaptieren und stoffwechselrelevante Enzyme aufzubauen. Nach dieser s.g. „Lag-Phase“ gehen Sie in die exponentielle Phase über. Auf Basis der Untersuchungsergebnisse im vorliegenden Projekt gehen wir davon aus, dass dieses logarithmisch verlaufende Wachstum in dem vorliegenden Fall durch die ortho-Phosphat-Verfügbarkeit in den eingesetzten Sickerwässern begrenzt wurde und dadurch nur wenige Tage andauerte.

In dieser Phase konnten im Projekt ERA<sup>3</sup> Wachstumsraten von bis zu 1,2 Gramm pro Liter pro Tag erreicht werden. War das Phosphat aufgebraucht, fiel die Wachstumsrate oft abrupt ab (Vergl. Abbildung 34). Dadurch ergaben sich im Anschluss an die exponentielle Phase deutlich geringe, teilweise negative Wachstumsraten, da das Wachstum der Algenkultur in die stationäre Phase und anschließend in die Absterbephase überging. Diese Wachstumslimitierung soll Bestandteil weiterer Untersuchungen werden. Im Vergleich zu anderen Studien (siehe Tabelle 12) sind die im Projekt ERA<sup>3</sup> erzielten maximalen Wachstumsraten jedoch sehr hoch und sprechen für die Verwendbarkeit von Mikroalgen in Deponiesickerwasser unter optimierten Bedingungen.

### AP 2.1: Parameterabhängige Wachstumsraten (pH-Wert, Temperatur, Lichtintensität, etc.) (Universität Gießen)

In den Versuchsreihen bei 18 °C zeigten alle Sickerwässer ein Wachstum, welches maximal halb so groß war wie das der Positiv-Kontrolle  $F_{/2}$ . Da die Sickerwässer einer Hausmülldeponie unter anderem durch Phenole und Huminsäuren eingefärbt und deshalb weniger lichtdurchlässig sind, ist das plausibel. Das gesteigerte Wachstum bei doppelter Beleuchtung im Vergleich zur einfachen Beleuchtung zeigt, dass nicht ausschließlich die Versorgung mit Nährstoff sondern natürlich auch das zur Verfügung stehende Licht das Wachstum und die Stoffwechselleistung der Algen limitieren.

In den Versuchsreihen bei 25 °C, bei einfacher und doppelter Beleuchtung konnten mit dem Sickerwasser der Deponie Reiskirchen die höchsten maximalen Wachstumsraten erzielt werden, obwohl die  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2\text{-N}$  und  $\text{PO}_4\text{-P}$  Konzentrationen am Versuchsstart unterhalb des Messbereiches lagen und auch die  $\text{NO}_3\text{-N}$  Konzentration relativ gering war. Mit dem selben Sickerwasser und vergleichbaren Anfangskonzentrationen der o.g. abwasserrelevanten Inhaltsstoffe wurde in der Versuchsreihe bei 30 °C (einfache und doppelte Beleuchtung) jedoch das geringste maximale Wachstum gemessen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es noch weitere Parameter gibt, die das Wachstum der Algen beeinflussen, die jedoch nicht im Rahmen der Versuchsreihe erfasst wurden. Auffällig sind bei den Ergebnissen der Wasseranalysen die unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen von  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2\text{-N}$  und  $\text{NO}_3\text{-N}$ , aber auch von Kalium, zwischen den verschiedenen Versuchsansätzen desselben Sickerwassers. Hier scheint es während der Lagerung in den Kanistern bei Raumtemperatur zu Abbau und Umwandlungsprozessen gekommen zu sein, sodass die Konzentrationen desselben Sickerwassers zu Anfang der jeweiligen Versuchsreihen schwanken und nicht konstant sind. Dieser Vorgang gilt in erster Linie für den Stickstoff und weniger für die anderen „stabileren“ Elemente. Hinzukommt, dass der Inhalt der Kanister zwar vor den Versuchsansätzen

umfangreich durchmischt wurde, dennoch sind gelöste und ungelöste Aggregate/Stoffe nicht auszuschließen, die eine höhere Streuung bedingen.

Ein solcher Parameter ist insbesondere im Zusammenspiel mit nicht optimalen Temperaturen der gelöste Ammoniak, der wie von Abeliovich & Azov beschrieben, bei einer Konzentration über 2,0 mM und pH-Werten über 8,0 toxisch auf das Algenwachstum und deren Photosynthese-Leistung wirken kann (Abeliovich and Azov, 1976).

Das Sickerwasser vom Speicher 1 der Leppe Deponie in Lindlar zeigte in allen Versuchsreihen immer ein vergleichsweises konstantes Wachstum. Ähnlich verhielt es sich mit dem Sickerwasser aus Aßlar. Beide Rohsickerwässer hatten eine vergleichbare Ammoniumkonzentration zu Beginn der Versuche bei einer Temperatur von 30 °C. Es liegt deshalb die Vermutung nahe, dass Ammonium als eine Art „Langzeitdünger“ wirkt und mit der Zeit zu Nitrat umgewandelt den Algen zur Verfügung steht.

Die konstanten und zum Teil leicht steigenden Nitrat-Konzentrationen im Verlauf der Kultivierung, sind ein guter Indikator für eine funktionierende Nitrifikation des Ammoniums zu Nitrat bei gleichzeitiger Reduzierung der Konzentration von NH<sub>4</sub>-N. Dennoch kann durch manchmal wahrgenommenen Ammoniakgeruch davon ausgegangen werden, dass nicht das gesamte Ammonium nitrifiziert wird, sondern zum Teil als Ammoniak ausgast und somit den Algen nicht zur Verfügung steht. Ein verstärktes Ausgasen bei höheren Wassertemperaturen ist ein möglicher Grund für die zum Teil reduzierten Wachstumsraten bei manchen Ansätzen bei 30 °C.

Kusumaningrum & Zainuri (2014) zeigen, dass die optimale Wachstumstemperatur für *Chlorella* zwischen 25 und 30 °C liegt (Pancasakti Kusumaningrum and Zainuri, 2014). Auch eine toxische Wirkung von Nitrit auf Algen ist in diesem Zusammenhang denkbar und wurde von Chen et al. (2012) für *Microcystis aeruginosa* beschrieben (Chen, Tong and Liu, 2012). Untermauert wird diese Vermutung durch die pH-Versuchsreihe. Durch konsequentes Einstellen des pH-Wertes mittels Salzsäure konnte sich das Gleichgewicht der Ammoniumkonzentration nicht auf die Seite des Ammoniaks verlagern. Dies führt dazu, dass der Stickstoff nicht als Ammoniak ausgast und über den gesamten Versuchszeitraum nitrifiziert werden kann. Dadurch kommt es zu einem Anstieg der Nitrat-Konzentration, wie es in Abbildung 17 dargestellt ist.

Während im nicht pH-Wert stabilisierten Ansatz der Ammonium-Stickstoff nicht mehr messbar ist und auch der Nitrat-Stickstoff konstant geblieben ist, kann man bei den pH-Wert stabilisierten Ansätzen die Ammonium-Stickstoff-Konzentration nach 14 Tagen immer noch messen. Auch die Nitrat-Konzentration ist gestiegen und nicht auf dem konstanten Niveau geblieben.

Ausgehend von den Wachstumsraten der pH-Wert Versuchsreihe und den Wachstumsverläufen der anderen Versuchsreihen lässt sich ableiten, dass zwischen pH-Wert 8 und pH-Wert 9,5 das optimale Wachstum von *Chlorella* sp. in Deponiesickerwässern mit einem hohen Ammonium-Stickstoff-Gehalt stattfindet. Da in diesem Bereich auch das Ammonium-Ammoniak-Gleichgewicht liegt, das auch temperaturabhängig ist, werden die Temperatur und der pH-Wert als zwei entscheidende Parameter identifiziert, wenn es um die Aufzucht von Algen im unverdünnten Sickerwässern geht. Hier könnte der zusätzliche Einsatz von CO<sub>2</sub> eine Möglichkeit sein, das Algenwachstum zu fördern und dabei die Gefahr einer Ammoniakhemmung des Algenwachstums zu verringern.

Unterstützende Ergebnisse für die These, dass aus Ammonium entstandenes Ammoniak einen negativen Einfluss auf das Algenwachstum in Deponiesickerwässern hat, liefert Zheng et al. (2019) in seinen Untersuchungen in jauchefreiem Abwasser aus Schweineställen (Zheng et al., 2019). Durch das Ammonium-Ammoniak-Gleichgewicht steigt bei ansteigendem pH und ansteigender Temperatur der Ammoniak-Anteil gegenüber dem Ammonium-Gehalt. Dieses Ammoniak könnte vor dem Ausgasen aus dem Sickerwasser einen toxischen Einfluss auf die Algen haben, wodurch diese in ihrem Wachstum gestört werden. Hält man die Kulturen bei einem niedrigeren pH und einer niedrigeren Temperatur

könnte die Ammoniakkonzentration nicht den kritischen Wert erreichen, um einen negativen Einfluss auf die Chlorella-Algen zu haben. In den Versuchen mit CO<sub>2</sub> Begasung wurde ein signifikant höheres Algenwachstum beobachtet. Neben dem bereits bekannten Vorteil der CO<sub>2</sub>-Begasung von Algen, dass es die zusätzliche Kohlenstoffquelle zum Biomasseaufbau verwendet, könnte der Einsatz von CO<sub>2</sub> der Algenkultivierung in Deponiesickerwässern auch einen positiven Effekt auf die Ammoniakkonzentration haben. Ammoniak reagiert mit CO<sub>2</sub> und Wasser zu Ammoniumcarbonat oder Ammoniumhydrogencarbonat (Hirschhornsalz) und bindet so das Ammoniak, sodass es keine toxische Wirkung mehr auf die Algen haben kann.

Die Ergebnisse zeigen zusammenfassend, dass optimale Wachstumsparameter für *Chlorella* in Deponiesickerwässern bei einer Temperatur von unter 25°C, einem pH-Wert von unter 9 und bei CO<sub>2</sub>-Begasung erreicht werden. Zu untersuchen bleiben die optimalen Beleuchtungsbedingungen. Gestützt werden diese Ergebnisse von Büscher et al. 2013, die in ihren Versuchen ebenfalls ein positives Wachstum im Temperaturbereich von 22-28 °C im Sickerwasser bei einem gleichzeitigen pH < 9 nachweisen konnten (Büscher, Harborth and Thiel, 2013). Dass die Regulierung des pH-Wertes ein kritischer Faktor zur erfolgreichen Kultivierung von Algen im Sickerwasser ist, wird von Büscher et al. 2017 bekräftigt, die Algen in verdünntem Sickerwasser kultivierten und einen pH-Wert durch CO<sub>2</sub>-Einspeisung zwischen pH 7 und 8 anstrebten (Büscher *et al.*, 2017). Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den üblichen Literaturquellen, nach denen die gefundenen Optima für ein optimales Wachstum von *C. vulgaris* bei einer Temperatur von 30 °C und einem pH-Wert zwischen 9 und 10 liegen.

#### AP 2.2: Bestimmung der Abbaukinetik von Abwasserinhaltsstoffen (TH-Köln)

Die Ergebnisse von Arbeitspaket 2.2 zeigen, dass es möglich ist, abwasserrelevante Inhaltsstoffe durch die Kultivierung standortangepasster Mikroalgen-Bakterien-Konsortien in hochbelasteten, nicht vorbehandelten, unverdünnten Deponiesickerwässern zu reduzieren. Dabei wurden vier unterschiedliche Sickerwässer von drei verschiedenen deutschen Deponien verwendet, welche eine große Bandbreite unterschiedlicher Belastungen repräsentierten. Die Inokulation mit dem Mikroalgen-Bakterien-Konsortium war statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) für den Abbau von NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N, CSB und PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P in den meisten getesteten Sickerwässern, aber wider Erwarten in keinem der getesteten Sickerwässer für NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N ( $p > 0,05$ ).

#### Ammonium

Ammonium wird als primäre Stickstoffquelle der Mikroalgen angenommen, da dessen Assimilation weniger Energie erfordert als die anderer gelöster Stickstoffspezies (Paskuliakova, Tonry and Touzet, 2016). Trotz der guten Wachstumsraten (siehe AP 1.5, ab Seite 17) führte die Inokulation mit dem standortangepassten Mikroalgen-Bakterien-Konsortium im Vergleich mit den Kontrollkulturen nicht zu einer signifikanten Abnahme der Ammonium Konzentrationen. In der Kultur „DA 4/5“ der Deponie Leppe war der Abbau in den Kontrollkulturen sogar besser als in den mit dem Mikroalgen-Bakterien-Konsortium inokulierten Kulturen.

Bisher haben nur wenige Studien gezeigt, dass die Kultivierung von Mikroalgen in Abwässern nicht zu einer Reduktion von Ammonium geführt hat (Edmundson, 2012; Ramli, Monday and Kazi, 2018). Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu vielen anderen Studien, die Ammoniumabbau bei *Chlorella* in einem Mikroalgen-Bakterien-Konsortium (Tighiri and Erkurt, 2019) oder in einer monoalgalen Kultur

(Lin *et al.*, 2007; Edmundson and Wilkie, 2013; Paskuliakova, Tonry and Touzet, 2016; Pereira *et al.*, 2016; Büscher *et al.*, 2017) nachweisen konnten. In manchen Studien konnte eine Ammoniumreduktion von bis zu 90% der Gesamtkonzentration in vergleichbaren Kultivierungszeiträumen nachgewiesen werden (Zhao *et al.*, 2014b; Gao *et al.*, 2015).

Es stellt sich jedoch die Frage, welchen Anteil die Algenassimilation an dieser Reduktion gehabt hat, da in vielen dieser Studien keine Kontrollkulturen ohne Algenkultivierung verwendet wurden. Neben der Assimilation durch Mikroalgen kann Ammonium auch durch die Umwandlung in Ammoniak entfernt werden, z.B. als pH-Wert abhängige, temperaturgesteuerte Ausgasung. Oder das Ammonium wird durch nitrifizierende Bakterien in Nitrit und Nitrat umgewandelt und dadurch aus der Lösung entfernt. Zhao *et al.* konnte zeigen, dass bis zu 48% des Ammoniaks als gasförmiges Ammoniak aus der Lösung ausgasen. Um das zu vermeiden wurde der pH-Wert in den beschriebenen Experimenten von ERA<sup>3</sup> durch permanente CO<sub>2</sub>-Zugabe in den Laborkulturen auf 6,5 bis 7 eingestellt. In diesem Bereich kann man bei einer konstanten Temperatur von 22°C im Laborabzug davon ausgehen, dass etwa 99,4 bis 99,82% des TAN's als Ammonium vorliegen (siehe Formel 1).

$$\% \text{ of } NH_3 \text{ of TAN} = \frac{100\%}{1 + 10^{(pKa-pH)}}$$

**Formel 1: Berechnung des Ammoniakanteils an der TAN-Gesamtkonzentration** (Claude E. Boyd, 1998; Körner *et al.*, 2001)

Eine Ammoniumausgasung in den Kulturen kann daher vernachlässigt werden. Diese Einschätzung wird durch die Nitrifikations-Massenbilanz zwischen Ammonium-Abbau und Nitrit/Nitrat-Aufbau unterstützt. Da Nitrat unter den gegebenen Bedingungen relativ stabil ist und keine Denitrifikation aufgrund der konstant aeroben Bedingungen durch die permanente Begasung erwartet werden kann, kann davon ausgegangen werden, dass das gesamte Nitrat in Lösung bleibt und dort nachgewiesen werden kann, wenn es nicht durch Assimilation in Algenbiomasse umgewandelt wurde.

Zwischen Tag 1 und 15 des 15-tägigen Kultivierungszeitraumes wurde, mit Ausnahme des Sickerwassers „DA 4/5“, annähernd das gesamte Ammonium in allen Kulturen in Nitrit oder Nitrat umgewandelt (siehe blauer Balken in Abbildung 35). Folglich entspricht die Differenz zur TAN-Zunahme der TAN-Menge, welche entweder als Ammonium assimiliert wurde oder als Ammoniak ausgegast ist (orangener Balken). Es kann also davon ausgegangen werden, dass in allen Kulturen, mit Ausnahme von „DA 4/5“, kaum Ammonium assimiliert- oder in Ammoniak umgewandelt worden ist.

Eine Ausnahme davon stellt das Sickerwasser vom Entnahmepunkt „DA 4/5“ dar. Dieses Sickerwasser wurde von einem Brunnen aus dem Inneren der Deponie erhalten, während alle anderen Sickerwässer von Oberflächenwassern erhalten wurden. Möglicherweise führte der fehlende Zugang zu Licht und Umgebungsluft bei dem Sickerwasser „DA 4/5“ zu einer anderen mikrobiellen Zusammensetzung und in Folge dessen zu höheren Nitrit/Nitrat-Assimilationsraten. Eine höhere Ammoniumassimilation durch Algen ist hingegen auszuschließen, da in den Kontrollkulturen genau so viel Ammonium abgebaut wurde, wie in den Kulturen, die mit dem standortangepassten Mikroalgen-Bakterien-Konsortium inokuliert wurden.



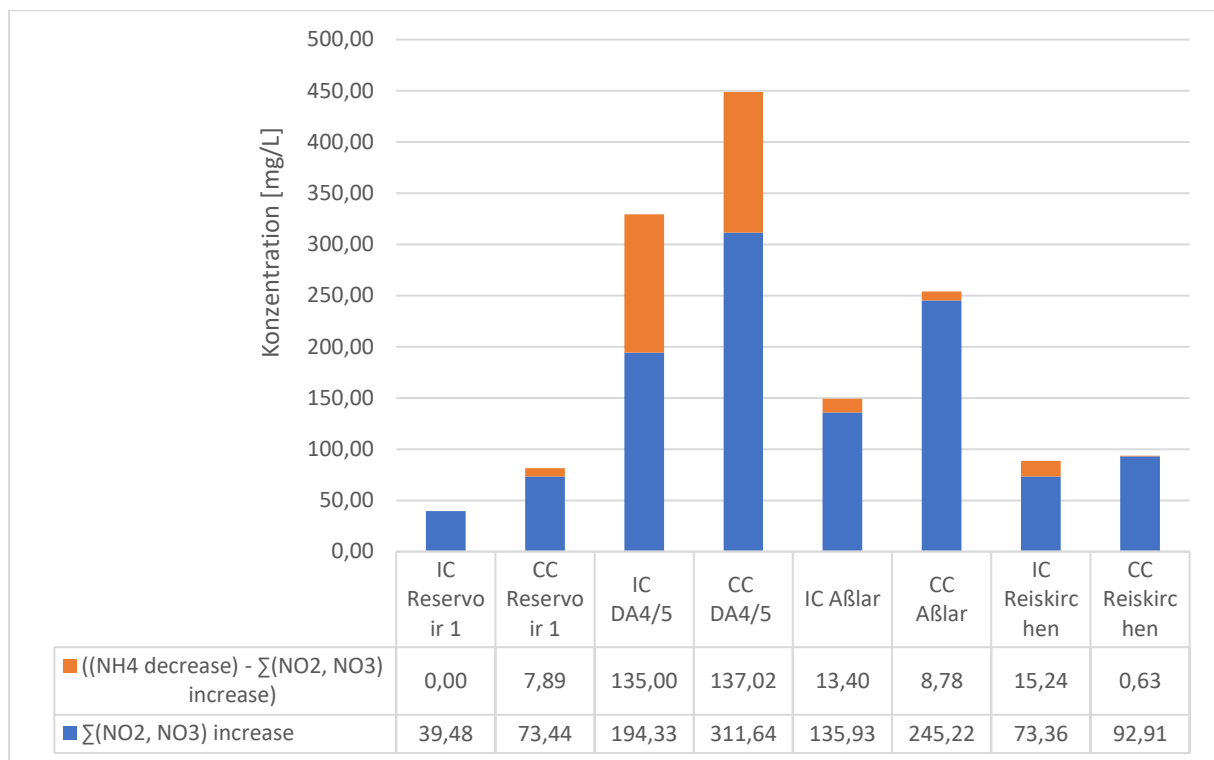


Abbildung 35: Massenbilanz der Ammonium-Stickstoff-Abnahme (orange Balken) und der Nitrit/Nitrat-Stickstoff Zunahme (blaue Balken) zwischen Tag 1 und 15 des 15-tägigen Kultivierungszeitraums.

Die hohen Ammoniumkonzentrationen bei gleichzeitig niedrigen Phosphatkonzentrationen in allen verwendeten Sickerwässern könnten zu den schlechten Ammonium-Abbauraten beigetragen haben. In verschiedenen Studien wurde der Effekt eines geringen P:N-Verhältnisses beschrieben, der zu schlechten Ammonium-Abbauraten führt (Paskuliakova, Tonry and Touzet, 2016; Pereira *et al.*, 2016). Die besten Abbauraten wurden bei einem P:N-Verhältnis von 1:12 festgestellt. In Sickerwässern ohne Phosphor war der Ammoniumabbau dagegen kaum nachweisbar. In den beschriebenen Versuchen wurde die Gesamtphosphor- und Gesamtstickstoffkonzentration zwar nicht absolut bestimmt, jedoch lassen die sehr hohen Ammoniumwerte bei den sehr geringen Phosphatkonzentrationen (Verhältnis < 1:222), nur ein geringes P:N-Verhältnis zu.

Publiziert ist, dass TAN, also sowohl Ammoniak als auch Ammonium, zur Inhibierung des Mikroalgenwachstums führen können (Xia and Murphy, 2016). Dass die Mikroalgenzellen im Mikroalgen-Bakterien-Konsortium vom Standort Leppe in der Lage sind, derartig hohe Ammoniumkonzentrationen auszuhalten, könnte neben synergetischen Effekten des natürlichen Mikroalgen-Bakterien-Konsortiums ebenfalls dadurch begründet sein, dass Ammonium nicht in die Zellen gelangt. Diese Hypothese wird dadurch bestärkt, dass kein Ammonium von den Algen assimiliert wurde. Folglich spricht die geringe Ammoniumassimilation für eine hohe Ammoniumtoleranz bzw. die hohe Ammoniumtoleranz für die Umstellung des Stoffwechsels des Mikroalgen-Bakterien-Konsortiums auf eine andere Stickstoffquelle. Hier kommen Nitrit und Nitrat in Frage, welche als alternative Stickstoffquellen von den Algen auch assimiliert werden können (Sanz-Luque *et al.*, 2015). Für unsere Untersuchungen bedeutet das, dass der Ammonium-Stickstoff zwar nicht direkt, aber auf einem Umweg über nitrifizierende Bakterien in die Mikroalgen aufgenommen werden könnte. Das lässt erwarten, dass gerade das Zusammenspiel dieser standortangepassten Gemeinschaft einen Weg zur Verwendung von Mikroalgen zur Wasseraufbereitung darstellt. Die Verwendung von Mikroalgen in der Aufbereitung von Abwässern könnte dann direkt zur Entlastung rein bakteriell arbeitender

Nitrifikations-/ Denitrifikationsstufen beitragen. Diese Möglichkeit soll in der weiteren Forschung anhand eines membranbasierten Photobioreaktors vergleichend mit suspensionsbasierten Systemen untersucht werden.

#### Nitrit und Nitrat

Sowohl die Nitrit- als auch die Nitratkonzentrationen nahmen während des Wachstums der Algen stark zu. Dies ist schlüssig, da die Laborkulturen permanent mit Sauerstoff begast wurden, welcher das Wachstum nitrifizierender Bakterien fördert. Es konnte auch gezeigt werden, dass die Nitrit- und die Nitratkonzentrationen nach dem 15-tägigen Kultivierungszeitraum in den inokulierten Kulturen signifikant ( $p < 0,05$ ) geringer waren als in den Kontrollkulturen. Das unterstützt die Behauptung, dass nicht wie erwartet Ammonium, sondern Nitrit und/oder Nitrat als Stickstoffquelle von den Algen assimiliert wurden. Die Verwendung dieser Stickstoffquellen wurde zuvor bereits für *Chlorophytae* beschrieben (Sanz-Luque *et al.*, 2015). Interessant ist jedoch, dass die Anwesenheit von Ammonium normalerweise zu einer Unterdrückung der Nitrit-Reduktase und des Nitrit/Nitrat-Transporters führt, welche für die Assimilation von Nitrit und Nitrat in *Chlorophytae* verantwortlich sind (Sanz-Luque *et al.*, 2015). Wenn das Mikroalgen-Bakterien-Konsortium trotz der hohen Ammoniumkonzentrationen Nitrit und Nitrat assimilieren kann, muss ein Mechanismus vorliegen, der die Repression durch das Ammonium verhindert, was es zu untersuchen wert wäre.

#### Ortho-Phosphat Phosphor

Im Verlauf des 15-tägigen Versuchszeitraums nahm die ortho-Phosphat Konzentration in allen Kulturen aller Sickerwässer stark ab. Die durchschnittliche Reduktion betrug 99,49% in den inokulierten Kulturen und 86,1% in den Kontrollkulturen. Die Inokulation mit dem standortangepassten Mikroalgen-Bakterien-Konsortium führte zu signifikant ( $p < 0,05$ ) geringeren Konzentrationen nach 15 tägiger Kultivierungszeit im Vergleich zu den Kontrollkulturen. Die Reduktion in den Kontrollkulturen ohne Inokulation kann durch die mikrobielle Aktivität der nicht sterilen Sickerwässer in den Kontrollkulturen erklärt werden, in denen das Mikroalgenwachstum durch die fehlende Inokulation nur verlangsamt werden konnte. Fällungsreaktionen des gelösten Phosphats können vernachlässigt werden, da dazu pH-Werte über 8 notwendig sind (Powell *et al.*, 2009). Der pH-Wert lag während der gesamten Kultivierungszeit bei 6,5 bis 7. Da Phosphat in allen inokulierten Kulturen beinahe oder völlig aufgebraucht wurde und höhere Phosphatkonzentrationen in allen Kontrollgruppen immer zu höheren Biomassekonzentrationen nach dem 15-tägigen Kultivierungszeitraum geführt haben (siehe auch Abbildung 34 auf Seite 49), kann davon ausgegangen werden, dass Phosphat unter den gegebenen Bedingungen der limitierende Faktor für das Algenwachstum gewesen ist. Dies entspricht den Ergebnissen von Tighiri und Erkurt, die *Chlorella* als dominante Spezies eines Mikroalgen-Bakterien-Konsortium zur Deponiesickerwasseraufbereitung verwendet haben (Tighiri and Erkurt, 2019).

#### Chemischer Sauerstoffbedarf

Der chemische Sauerstoffbedarf wurde verwendet, um den Gehalt organischer Bestandteile im Deponiesickerwasser indirekt zu bestimmen. Während des 15-tägigen Versuchszeitraumes nahm der CSB-Wert in den meisten Kulturen ab. Die Inokulation mit dem Mikroalgen-Bakterien-Konsortium führte nach 15-tägiger Kultivierungszeit in der Regel zu signifikant geringeren ( $p < 0,05$ ) CSB-Werten im Vergleich zu den Kontrollkulturen ohne Inokulation.

Der Abbau von organischen Verbindungen kann auf die Aktivität heterotropher Mikroorganismen zurückgeführt werden. Auch eine heterotrophe Aktivität der Mikroalgen wäre möglich, da manche

Mikroalgen, wie auch *Chlorella* sp., mixotroph leben können, wenn entsprechende Kohlenstoffquellen vorhanden sind (Pereira *et al.*, 2016; Roostaei *et al.*, 2018). Das mixotrophe Wachstum der Mikroalgen scheint auch vor dem Hintergrund plausibel, dass die an das zum Teil stark eingetrübte Sickerwasser angepassten Zellen gewohnt sind, mit Lichtlimitation zurecht zu kommen und bereitwillig auf andere Energiequellen zurückgreifen. Dieses Ergebnis stimmt überein mit denen anderer Forschungsprojekte, die *Chlorella* sp. in Deponiesickerwässern verwendet haben (Limnosun, 2016; Pereira *et al.*, 2016).

### AP 2.3: Biomassebildung unter variierenden Kultivierungsbedingungen (Upscaling) (TH-Köln)

Die Verwendung von Mikroalgen zur Deponiesickerwasseraufbereitung ist relativ neu. Bisher sind noch keine standardisierten Verfahrenstechniken oder Kultivierungskonzepte entwickelt worden. Zwei zentrale Konzepte spielen bei der Kultivierung eine übergeordnete Rolle: Suspension- und Biofilmbasierte Systeme (Nawaz *et al.*, 2020). Die wenigen bisher in Deponiesickerwasser durchgeführten Vergleichsstudien befürworten die Verwendung von biofilmbasierten Systemen (Zhang and Cheng, 2018; Chang *et al.*, 2019). Zur Aufbereitung anderer Abwässer wurde in aktuellen Vergleichsstudien der membranbasierte Ansatz als vorteilhaft dargestellt (Zhuang *et al.*, 2018b). Aufgrund der großen Vielfalt an Kultivierungsparametern und dem Fehlen standardisierter Methoden besteht jedoch trotz zahlreicher Publikationen und Projekte bisher kein Konsens.

Die im Arbeitspaket 2.3 erhaltenen Ergebnisse befürworten den Einsatz einer biofilmbasierten Kultivierung bei der Verwendung der stark eingetrübten Deponiesickerwässer. Ein Vorteil des membranbasierten Kultivierungssystem besteht vor allem darin, dass die Höhe des Wasserstands im Vergleich zu den suspensionsbasierten Kulturen keinen Einfluss auf die Kultivierbarkeit der Algen hat, da die Algen direkt an der Membranoberfläche schwimmen. Mikroskopisch wurden Veränderungen und Diversifizierungen der Algenbiozönosen in den Biofilmen im Vergleich zu den Suspensionskulturen nachgewiesen (vgl. Abbildung 2 und Abbildung 32). In den Suspensionskulturen wurden bisher ausschließlich Algen der Gattung *Chlorella* sp. gefunden. In den untersuchten Biofilmen traten neben dieser Gattung noch weitere, bisher nicht näher identifizierte Stäbchen- und kettenförmige Mikroalgen auf. Diese gesteigerte Diversität ist typisch für Biofilme (Boles, Thoendel and Singh, 2004) und könnte sich positiv auf die Aufrechterhaltung eines kontinuierlichen Aufbereitungsprozesses auswirken. Cho *et al.* konnten bereits demonstrieren, dass bei der Aufbereitung von Abwässern insbesondere eine Diversifizierung der Mikroalgenzusammensetzung essentiell ist für die Anpassung der Algen an sich verändernde Umweltgegebenheiten (Cho *et al.*, 2017). Die Bereitstellung von geeigneten Oberflächen und Lichtquellen führte im Fall der vorliegenden Untersuchungen auch ohne Inokulation mit dem zuvor isolierten Mikroalgen-Bakterien-Konsortium zu Algenwachstum auf den Membranen (Kultur B). Dabei führte die Nichtinokulation zur Ausbildung einer veränderten Mikroalgenzusammensetzung. Wie in Abbildung 32 gezeigt sind hier neben den bekannten *Chlorella* sp. Zellen wesentlich mehr lange Ketten stäbchenförmiger Mikroalgen zu erkennen. In der Kultur (A), welche zu Beginn des Versuchs mit dem in suspensionsbasierten Stammkulturen vor-kultivierten, standortangepassten Mikroalgen-Bakterien-Konsortium inokuliert wurde, ist das nicht so. Diese Veränderung spricht in besonderer Weise für die Anpassungsfähigkeit der Mikroalgen unter den wechselnden Bedingungen im Deponiesickerwasser und damit für dessen Verwendung zur Phycoremediation. In diesem Zusammenhang spielen auch die Abbaufähigkeiten abwasserrelevanter Inhaltsstoffe eine wichtige Rolle. Insbesondere der Abbau von Ammonium und organischen Verbindungen ist bei der Aufbereitung von Deponiesickerwässern wichtig, da diese in herkömmlichen Aufbereitungsverfahren große Kosten verursachen (Spekat, Enke

and Kreienkamp, 2007; Bharagava and Chowdhary, 2018). In AP 2.2. wurde festgestellt, dass die Inokulation mit dem Mikroalgen-Bakterien-Konsortium nach 15-tägiger Kultivierung zwar in der Regel zu einer signifikanten Reduktion von Nitrit, Nitrat, ortho-Phosphat und dem CSB-Wert im Vergleich zu den uninokulierten Kontrollkulturen führten, jedoch wurde kein Ammonium abgebaut. Demgegenüber wurde im vorliegenden AP 2.3 in den Kontrollgruppen A und B, in denen Algenwachstum stattgefunden hat, mehr Ammonium abgebaut als in der Kontrollgruppe C, ohne Algenwachstum. Dies kann möglicherweise auf die höhere Diversität in den Biofilmen zurückzuführen sein. Die Konzentrationen von Ammonium und Phosphat ließen sich auf diese Weise auf Indirekteinleiterkriterien (AbwV, 2016) reduzieren.

Eine Begrenzung des vorhandenen Versuchs stellt jedoch die Verwendung eines einzigen IBC's pro Kontrollgruppe dar. Der Umfang von ERA<sup>3</sup> ließ in Phase I keine Implementierung von Mehrfachbestimmungen im IBC-Maßstab zu. Die Verwendung der abgedunkelten Kontrollgruppe C stellt zudem eine Verletzung des Ceteris paribus Prinzips, nachdem nur ein Wachstumsfaktor variiert werden darf. Eine Alternative zur Verhinderung des Algenwachstums wäre die Verwendung steriler Deponiesickerwässer gewesen, was jedoch dem Grundgedanken des Projektes, unvorbehandelte Sickerwässer zu verwenden, widersprochen hätte.















Bei einem Wasserstand von 10 cm konnte mit Suspensionskulturen kein Algenwachstum im Batchversuch im 120 L-Maßstab nachgewiesen werden. Erst durch Umbau des IBC's in einen „Raceway“ und durch Verdopplung der Lichtintensität ließ sich ein besseres Algenwachstum in der Suspension erzeugen. Der zusätzliche Eintrag von Sickerwasser im „Fed-Batch“ führte jedoch zu Störungen des offensichtlich in Suspensionskultur besonders sensiblen Algenwachstums. Es wird angenommen, dass sich besonders die starke Trübung der Sickerwässer unter den gegebenen Versuchsbedingungen nachteilig auf die Lichtverfügbarkeit der Algenzellen und deren Wachstumsraten auswirkt.

Ein Vergleich der Wachstumsraten zu den biofilmbasierten Kulturen ist quantitativ nicht direkt möglich, da das Wachstum hier anhand der geernteten Biomasse pro Fläche gemessen wird und nicht, wie in den Suspensionen, in Gramm Biomasse pro Volumen. Aufgrund der begrenzten Vergleichbarkeit hinsichtlich des Kultivierungsertrages erscheint es sinnvoller, den Aufwand und die Praktikabilität der Systeme miteinander zu vergleichen, die nötig sind, um eine bestimmte Menge Biomasse zu produzieren oder eine bestimmte Menge Abwasser aufzureinigen.

Aufwand und Praktikabilität sollen deshalb in zukünftigen Untersuchungen im halbtechnischen Maßstab anhand der Parameter Biomasseproduktion und Reinigungsleistung quantitativ oder semiquantitativ untersucht werden um suspensions- und biofilmbasierte Systeme miteinander vergleichen zu können.

In der folgenden Tabelle 13 sind die in der einschlägigen Literatur genannten typischen Vor- und Nachteile beider Systeme sowie die Erfahrungen der vorliegenden Studie aufgeführt und sollen die Beantragung der Zielstellungen für Phase II unterstützen.

Tabelle 13: Vor- und Nachteile von biofilm- und suspensionsbasierter Kultivierung

Biofilmbasierte Kultivierungssysteme	Suspensionsbasierte Kultivierungssysteme
 Bessere Lichtausbeute	 Limitation durch begrenztes Volumen-Oberflächen-Verhältnis
 Höhere Stressresistenz gegenüber hoher Konzentrationen abwasserrelevanter Inhaltsstoffe (Roeselers, Loosdrecht and Muyzer, 2008)	
 Höhere Zellkonzentrationen durch natürliche Aufkonzentrierung der Algenbiomasse in den Biofilmen (Zhang and Cheng, 2018).	 Ernte und Aufkonzentration der Algenbiomasse verursacht etwa 20-30 % der gesamten Produktionskosten (Molina Grima <i>et al.</i> , 2003)
 Trennung von Algenbiomasse und Sickerwasser (Shi, Podola and Melkonian, 2014)	 Mikroalgen im Abfluss der Abwasseraufbereitung verursachen 60-90% des Biologischen Sauerstoffbedarfs (He and Xue, 2010)
 Unabhängigkeit von hydraulischen Retentionszeiten und den Retentionszeiten der Mikroalgen (Gross, Jarboe and Wen, 2015)	
 Biofouling der Membranoberflächen	
 Ungleichmäßige Verteilung von Wachstumsparametern wie Nährstoffen, pH-Werten und Lichtintensitäten (Wolf, Picioreanu and Van Loosdrecht, 2007)	
 Entwicklungs- und Forschungsarbeit aufgrund bisher fehlender Etablierung steht zum Teil noch aus	 Etablierte Systeme (Zittelli, Graciella Chini; Rodolfi, Liliana; Bassi, Niccolo; Tredici, 2013)
 Höhere Investitions- und Forschungskosten	 Geringere Investitionskosten

## Arbeitspaket 3 – Zwischenbericht

Der Zwischenbericht wurde fristgerecht zum 31.04.2020 angefertigt und dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) vorgelegt.

## Arbeitspaket 4 – Vorplanung der halbtechnischen Pilotanlage

Die bereits im Projektantrag definierte Phase II ist notwendig, um die in der Phase I gewonnenen Ergebnisse in einen halbtechnischen Maßstab zu übertragen. Die Vorplanung der halbtechnischen Pilotanlage erfolgte zum einen auf der Grundlage der bisher in der ersten Projektphase ermittelten Ergebnisse. Zum anderen wird auf der Grundlage ähnlicher aktueller Studien, die sich bereits mit dem Thema der Hochskalierung von mikroalgenbasierten Systemen beschäftigt haben, weiter geplant und gearbeitet.

Vor dem Hintergrund der im experimentellen Teil gelieferten Ergebnisse, ist die Skalierung in einen großtechnischen Maßstab sinnvoll und realistisch, verlangt aber nach einem reproduzierbarem, industriell anwendbarem und ökonomisch sinnvollem Kultivierungskonzept. Neben der Grundvoraussetzung der Kultivierbarkeit bei unterschiedlichen Belastungen und der Reduzierung abwasserrelevanter Parameter spielen bei der Skalierung des Systems die Entwicklung eines besseren ursächlichen Verständnisses für die Flexibilität des Stoffwechsel- und das Proliferationsverhalten der Mikrobiozöten sowie die technische Durchführbarkeit unter ökonomischen Aspekten eine wichtige Rolle. Für unseren Anwendungszweck von Deponien mit begrenztem Platz scheint die Verwendung eines membran-/biofilmbasierten Systems vorteilhaft, da die Membranen auch vertikal angeordnet werden können. Diese Kultivierungstechnik stellt den neuesten Stand der Mikroalgenkultivierung in Abwässern dar und soll deshalb Gegenstand der Untersuchungen in Phase II sein. Verschiedene Studien konnten bereits demonstrieren, dass die Verwendung von membran-/biofilmbasierten Kultivierungskonzepten in Verbindung mit der Verwendung von Deponiesickerwasser als Wachstumsmedium, Vorteile gegenüber Suspensionskulturen besitzt (Zhang and Cheng, 2018; Chang *et al.*, 2019). In diesen Studien konnten sowohl die Abbauraten abwasserrelevanter Inhaltsstoffe als auch die Wachstumsraten der Algen durch die Kultivierung in einem biofilmbasierten System im Vergleich zu suspensionsbasierten Systemen gesteigert werden.

Eine im Journal Nature veröffentlichte Studie zur biofilmbasierten Mikroalgenkultivierung in Abwässern stellt die besonderen Vorteile dieser Kultivierungstechnik in Verbindung mit einer mixotrophen Kultivierbarkeit der Algenkulturen heraus (Roostaei *et al.*, 2018). Diese Kultivierungstechnik soll geringere Erntekosten eines biofilmbasierten Systems mit hohen Wachstumsraten einer mixotrophen Kultivierung sowie einer verringerten Abhängigkeit gegenüber der sich verändernden Lichtverfügbarkeit im Jahreszyklus vereinen. Im Artikel wurde beschrieben, dass sich die Qualität der Algenbiomasse zur Biokraftstoffproduktion gegenüber einer suspensionsbasierten, rein photoautotrophen Kultivierungsweise verbessern ließ.

Die herkömmlichen Open-Pond Systeme, wie sie zum Beispiel zur Kultivierung von Algen für die Nahrungsmittelindustrie eingesetzt werden, haben vergleichsweise geringe Anschaffungskosten, sind leicht zu bewirtschaften und haben moderate Wachstumsraten. Bei der Verwendung von stark eingetrübten Abwässern kann es jedoch zu einer Lichtlimitation kommen (siehe AP 2.3). Gleichzeitig ist die Konzentration der Mikroalgen in den Suspensionen sehr gering. Dadurch ergibt sich ein

verhältnismäßig hoher Platzbedarf an flachen Becken und die technische Herausforderung, die Algen nach oder während der Kultivierung aus dem Medium zu entfernen und aufkonzentrieren zu müssen (Davis, Aden and Pienkos, 2011). Um die Aufbereitung der Deponiesickerwässer mit Mikroalgen hinsichtlich des Aufwandes und der damit verbundenen Kosten, sollen insbesondere die Faktoren der Abbauraten abwasserrelevanter Inhaltsstoffe, Biomasseaufbau, Anschaffungs- und Betriebskosten, Wartungs- und Instandhaltungskosten sowie die Personalkosten zum Betrieb der Systeme herangezogen werden.

Es hatte sich in Phase I (AP 2.3) schon gezeigt, dass es Skalierungseffekte und unterschiedliche Wachstumsraten in den unterschiedlichen Systemen gibt, die in den suspensionsbasierten Systemen vor allem mit dem Verhältnis des Wasservolumens zur Wasseroberfläche bzw. der Lichtverfügbarkeit in Verbindung gebracht wurden.

Folgende Punkte sind im Rahmen der Vorbereitung für den Aufbau einer halbtechnischen Pilotanlage berücksichtigt worden:

(1) **Mikrobiozönose:** Als dominierende Algengattung wurde *Chlorella sp.* identifiziert. Diese Gattung ist immer wieder Thema von Phycoremediationsstudien, da sie vergleichsweise hohe Konzentrationen an Ammonium, Ammoniak und anderen phytotoxischen Abwasserinhaltsstoffen aushalten kann. Ein Grund dafür ist die Fähigkeit einiger Vertreter dieser Gattung, große Mengen extrazellulärer polymerer Substanzen auszuscheiden (Bellinger and Sigee, 2010). Diese sind wichtig bei der Ausbildung von Biofilmen und der Entstehung von Mikroorganismengemeinschaften, welche wiederum zu synergetischen Effekten führen können und dadurch die Stressresistenz in extremen Lebensräumen erhöhen. In den im Rahmen der vorliegenden Studie untersuchten Sickerwässern konnten in den suspensionsbasierten Experimenten ausschließlich *Chlorella sp.* in einem Konsortium anderer Mikroorganismen gefunden werden. Bei Versuchen in membranbasierten Systemen, welche die Entstehung von Biofilmen begünstigen, wurden neben dieser Gattung auch andere Mikroalgen oder Cyanobakterien gefunden, die bisher noch nicht näher charakterisiert wurden. Es wird davon ausgegangen, dass die Biofilme durch die Entstehung schützender Subsysteme und einer damit verbundenen höheren Stressresistenz der darin eingeschlossenen Mikroorganismen zu einer Diversifizierung dieser Mikrobiozönosen führen. Zwar ist die genaue Zusammensetzung bisher nicht bekannt, aufgrund des positiven Wachstumsverhaltens in allen Sickerwässern kann jedoch von einem symbiotischen Gefüge ausgegangen werden, welches robust genug ist, sich an die dynamischen Bedingungen dieser extremen Lebensräume anzupassen.

(2) **Beleuchtung, pH-Wert und Temperatur:** Es zeigte sich, dass die Wachstumsfaktoren Beleuchtung, pH-Wert und Temperatur großen Einfluss auf das Wachstum der Mikroalgen hatten. Es ist deshalb sinnvoll, ein automatisiertes System aufzubauen, in dem diese Parameter automatisch erfasst und reguliert werden können, um das Algenwachstum zu optimieren und Personalkosten einzusparen. Auf dieser Grundlage soll in der zweiten Projektphase der Einfluss einzelner Wachstumsfaktoren im Gesamtgefüge aller Wachstumsfaktoren bewertet werden.

(3) **Inokulum:** In den Wachstumsversuchen (AP 1.5) und den Skalierungsversuchen (AP 2.3) wurde festgestellt, dass das Mikroalgenwachstum auch in den nicht inokulierten Kontrollkulturen (reines Rohsickerwasser) stattfand. Auch wenn dies nicht beabsichtigt war, zeigt es eindrucklich, dass sich die Mikroalgen auch bei sehr geringen Ausgangskonzentrationen in den Sickerwässern durchsetzen können. Für die großtechnische Skalierung bedeutet dies, dass in einem kontinuierlichen Prozess im

Normalfall keine fortlaufende Inokulierung notwendig ist, was wiederum die Aufrechterhaltung dieses Prozesses erleichtern könnte.

(4) **Verdünnung/Vorbehandlung:** In den Arbeitspaketen 1.5, 2.1 und 2.3 konnte gezeigt werden, dass Mikroalgenwachstum in verschiedenen, unverdünnten und nicht vorbehandelten Sickerwässern möglich ist. Dieses Ergebnis wird als Grundvoraussetzung für die Skalierung in den technischen Maßstab angesehen.

(5) **Verwendung von Sickerwässern mit unterschiedlichen Belastungen an abwasserrelevanten Inhaltsstoffen:** Die Ergebnisse von AP 1.5 zeigen, dass die Mikroalgen in vier verschiedenen Sickerwässern mit einer großen Bandbreite an Belastungen, mit wiederholbaren Wachstumsraten von bis zu 1,2 g TS/(l\*d), wachsen. Dabei schwankten die Konzentrationen von Ammonium, welches häufig als phytotoxisch beschrieben wurde, zwischen 244 und 934,01 mg/L. Die CSB-Werte, welche indirekt die Konzentrationen organischer Verbindungen beschreiben und sich auf die Trübung der Sickerwässer auswirken, lagen in den verschiedenen Sickerwässern zwischen 476 und 2.042 mg/L. Interessanter Weise führten unter den gegebenen Bedingungen (siehe AP 1.5) höhere Belastungen mit Ammonium oder organischen Verbindungen (CSB) in der Regel sogar zu höheren Algenbiomassekonzentrationen nach 15 tägiger Kultivierungszeit. Dieses Ergebnis ist wichtig für die großtechnische Skalierbarkeit, da diese nur bei Verwendbarkeit verschiedener Sickerwässer und sich periodisch ändernder Sickerwasserzusammensetzungen praktikabel und ökonomisch ist. Temporäre Schwankungen der Sickerwasserzusammensetzung treten z.B. regelmäßig durch jahreszeitliche klimatische Veränderungen wie variierende Niederschlagsmengen oder Temperaturveränderungen auf.

## Ergebnisse

Auf der Grundlage der in diesem Bericht vorgelegten Ergebnisse sowie der durchgeführten und beschriebenen Literaturrecherchen, soll im Rahmen der Projektphase II ein kommerziell erhältliches, membranbasiertes Mikroalgenkultivierungssystem der Firma Phytolinc in Köln als Hauptsystem der weiteren Forschungsarbeiten eingesetzt werden.

Bei der Phytobox handelt es sich um ein kommerziell erhältliches Algenkultivierungssystem (Photobioreaktorsystem), bei dem die Algen in einem Biofilm auf vertikal angebrachten, so genannten „Twin-Layer-Membranen“ wachsen. Das System ist in der folgenden Abbildung 36 dargestellt. Es besitzt Abmessungen von 0,97 x 1,53 x 2,61 m und eine Membranfläche von ca. 3 m<sup>2</sup>. Die patentierten „Twin-Layer-Membranen“ werden oben in eine Aufhängung eingeschoben. Über der Membran befindet sich eine Leiste mit Wassertropfern, welche das Sickerwasser von oben in die Membranen eintropfen. Unter der Algenfläche ist ein Tank verbaut, indem sich das Medium befindet. Der Tank soll für unsere Anwendung etwa 200 Liter fassen. Dadurch können in einem sinnvollen Maßstab Versuche sowohl im Batch- als auch im semikontinuierlichen bzw. kontinuierlichen Betrieb durchgeführt werden. Die Beleuchtung erfolgt mit energiesparenden LED's, welche vor die Membranflächen montiert werden. Darüber hinaus ist ein digitales Kontrollsystem in der Phytobox integriert. Dieses soll die Messung/Speicherung und Steuerung relevanter Kultivierungsparameter (pH-Wert, Temperatur im Medium, Lufttemperatur im Reaktor, Luftaußentemperatur, CO<sub>2</sub>-Konzentration, Lichtintensität, Konduktivität, etc.) ermöglichen. Zusätzlich sollen mit Hilfe von atline-gekoppelten Messsonden für das Prozessverständnis wichtige, weitere Kultivierungsparameter wie beispielsweise die



Ammoniumkonzentrationen, erfasst werden. Durch das computerbasierte Kontrollsystem und den Einsatz von Automatisierungstechnik soll eine Steuerung der wichtigsten Geräte im Gesamtsystem ermöglicht werden.



Abbildung 36: „PhytoBox“ – System der Firma Phytolinc (Quelle: Phytolinc UG)

Die in diesem System integrierten s.g. „Twin-Layer-Membranen“ wurden 2004 an der Universität zu Köln entwickelt und patentiert (Melkonian and Podola, 2004). Das gesamte System befindet sich aktuell in der Antragsphase für ein weiteres Patent (Bioreactor and method for treating at least one fluid and/or cultivating phototrophic organisms // 19807EP). Dabei ermöglichen zwei aneinander liegende Membranen eine Trennung von Medium und Algenbiomasse. Die Mikroalgen wachsen auf den äußeren Membranen in Biofilmen während das Medium zwischen den Membranen hindurch läuft (siehe Abbildung 37).

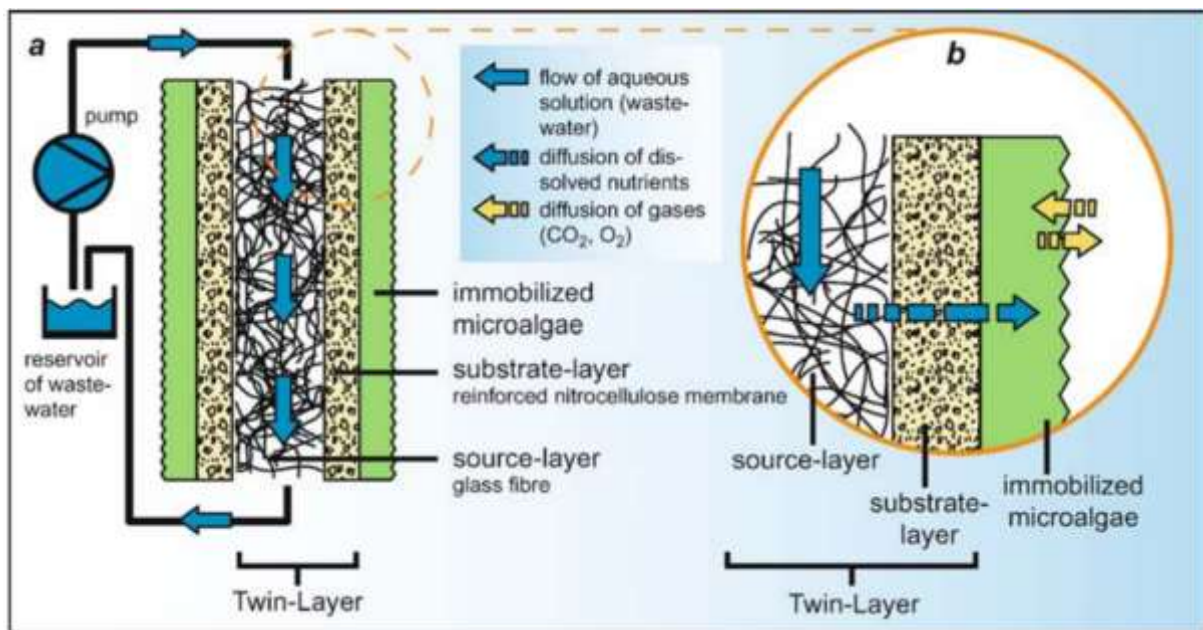


Abbildung 37: Schematische Darstellung der patentierten „Twin-Layer-Membran“ (Shi, Podola and Melkonian, 2007)

Damit wird erreicht, dass das Wachstumsmedium nicht mit Algenbiomasse kontaminiert wird und die Algen sich auf natürliche Weise in den Biofilmen aufkonzentrieren. Nach oder während des Kultivierungsvorgangs können die Algen von den Membranen in konzentrierter Form geerntet werden, wodurch ein kostenintensiver Ernteschritt wie bei den suspensionsbasierten Kulturen entfällt. Gleichzeitig wird verhindert, dass die Algen in die anschließenden Wasseraufbereitungsschritte eingetragen werden. Durch die Verwendung dieses Systems soll eine höhere Stressresistenz und eine geringere Kontamination der Kulturen erreicht werden. In verschiedenen Studien mit dem „Twin-Layer-System“ der Universität Köln konnten diese und weitere Vorteile bereits demonstriert werden (Shi, Podola and Melkonian, 2007, 2014; Naumann *et al.*, 2013; Schultze *et al.*, 2015). Auch bei Verwendung verschiedener Abwässer als Kultivierungsmedium konnte die Praktikabilität einer membranbasierten Kultivierung von Mikroalgen beschrieben werden (Mallick, 2002; Patwardhan, 2003; García-Meza, Barrangue and Admiraal, 2005; Ozkan *et al.*, 2012; Gross, Jarboe and Wen, 2015; Roostaei *et al.*, 2018). Deponiesickerwasser wurde bisher jedoch noch nicht als Medium für die Algen eingesetzt.

Unserer Kenntnis nach, gibt es bisher kein vergleichbares, kommerziell erhältliches System. Die Alternative, im Rahmen des Projektes ERA<sup>3</sup> ein vergleichbares System, inklusive der darin verbauten Automatisierungs- und Kontrolltechnik sowie der patentierten Membranen selbst zu entwickeln oder von einem Anlagenbauer entwickeln zu lassen, erscheint unrealistisch.

Die bisherige Entwicklungsarbeit, die von Prof. Melkonian an der Universität Köln sowie der Phytolinc UG zur Entwicklung eines vergleichbaren Prototypens erbracht wurde, kann nicht im Rahmen des Projektes ERA<sup>3</sup> und unter einem vergleichbaren Kostenaufwand erbracht werden.

Im Folgenden wird die Planung der einzelnen Arbeitspakete der Projektphase II im Detail beschrieben:

### AP 3: Aufbau und Betrieb einer halbtechnischen Pilotanlage

Auf der Grundlage der bisherigen Ergebnisse sowie der durchgeführten Literaturrecherchen soll im Rahmen der zweiten Projektphase ein an der UZK erprobtes und jetzt kommerziell erhältliches,

membranbasiertes Mikroalgenkultivierungssystem der Firma Phytolinc als Hauptsystem der weiteren Forschungsarbeiten eingesetzt werden.

Der membranbasierte Ansatz besteht aus zwei Phytobox-Systemen. Ein System soll über die Universität Köln (Arbeitskreis Prof. Dr. Hartmut Arndt) geliehen werden. Das andere soll im Falle der Projektverlängerung über den assoziierten Partner Bergischer Abfallwirtschaftsverband (BAV) finanziert werden. Auf diese Weise wird ein Vergleichsansatz zwischen zwei Kontrollgruppen, unter sonst gleichen Bedingungen (Ceteris-Paribus-Prinzip), in getrennten Subsystemen ermöglicht. In diesen Subsystemen werden spezielle Grundmembranen (Typ 3-D-Mesh) verwendet, auf die eine geeignete Anzahl separierter Substratmembranen (Typ 1.2) mit definierter Größe aufgebracht werden können. Auf diese Weise können einzelne Substratmembranen im Laufe eines Kultivierungszyklus in regelmäßigen Abständen von den Grundmembranen „geerntet“, das Algenwachstum kontinuierlich überwacht- und die Auswirkungen veränderter Kultivierungsparameter im Laufe eines Kultivierungszyklus kontinuierlich erfasst werden. Durch die Verwendung dieses Konzeptes soll eine statistisch signifikante Aussage mit hohem Signifikanzniveau der erhaltenen Ergebnisse ermöglicht werden.

### AP 3.1: Aufbau eines offenen Mikroalgenkultivierungssystems mit Prozesssteuerung und Modellbildung

Der Aufbau des offenen Mikroalgenkultivierungssystems mit Prozesssteuerung soll im membranbasierten „PhytoBoX“-System der Firma Phytolinc erfolgen. Die PhytoBoX ist mit einem elektronischen Kontrollsystem und einer automatisierten Steuerung ausgestattet. Es wird die Echtzeitkontrolle der wichtigsten Parameter durchgeführt. Zusätzlich werden mit Hilfe von atline-gekoppelten Messsonden weitere nötige Kultivierungsparameter wie Ammoniumwerte erfasst.

Auf der Grundlage eines zuvor durchgeführten Pilotprojektes (Pilot-Bergische Ressourcenschmiede), in der der Einfluss verschiedener Kultivierungsparameter wie der Lichtintensität auf das Algenwachstum ermittelt werden soll, wird eine modellbasierte Prozesssteuerung aufgebaut. Dazu wird ein kinetisches Wachstumsmodell entwickelt, welches die spezifische Anwendung im Deponiesickerwasser sowie die Diversität des standortangepassten Mikroalgen-Bakterien Konsortiums berücksichtigt. Bisher wurden nur wenige kinetische Modelle für biofilmbasierte Kultivierungssysteme beschrieben (Gera *et al.*, 2016; Feng *et al.*, 2020). Keines dieser monofaktoriellen Modelle ist bisher in der Lage, die Wachstumsraten in Abhängigkeit von verschiedenen co-limitierenden Wachstumsfaktoren abzubilden. Derartige Modellierungen werden häufig dazu verwendet, kontrollierte Laborbedingungen zu beschreiben (Lee, Jalalizadeh and Zhang, 2015). Multifaktorielle Modelle basieren hingegen auch auf co-limitierenden Faktoren und ermöglichen eine komplexere Beschreibung der Abhängigkeiten.

Die Entwicklung eines derartigen Modells, könnte bei der Skalierung des mikroalgen-basierten Deponiesickerwasseraufbereitungssystems in einen technischen Maßstab wesentlich zur Optimierung der Kultivierungstechnik beitragen. Auch die CO<sub>2</sub>-Verfügbarkeit soll in die Modellierung einfließen, da die Kulturen bei einer Skalierung in den technischen Maßstab mit überschüssigem CO<sub>2</sub> aus der Biogasanlage begast werden sollen. Dies kann den litho-autotrophen Stoffwechsel der Algen erhöhen und verwertet gleichzeitig überschüssiges CO<sub>2</sub>. Durch hohe pH-Werte und fotosynthetischen Abbau kann es jedoch schnell zu einer verringerten Verfügbarkeit und folglich zu einer Limitation kommen. Zu hohe CO<sub>2</sub>-Konzentrationen können wiederum zu inhibierenden Effekten führen. Zudem wurden bisher in der Regel Modelle entwickelt, die ausschließlich für eine oder maximal zwei verschiedene Algengattungen gelten (Blanken *et al.*, 2016). Bei der Verwendung von Mikroalgen zur Abwasseraufbereitung sind isolierte Spezies jedoch nicht praktikabel. Ein theoretisches Modell muss

deshalb in der Lage sein, den Einfluss verschiedener Kultivierungsparameter auf dynamische Mikrobiozösen beschreiben zu können. Derartige Wechselwirkungen wurden bereits in Wachstumsmodellen zur Abschätzung von Algenblüten beschrieben (Hamilton and Schladow, 1997) und sollen in die Modellierung integriert werden.

Im Verlauf der Projektphase II von ERA hoch 3 soll das zuvor im Pilotprojekt Bergsiche Ressourcenschmiede entwickelte Modell kalibriert und weiterentwickelt werden.

#### AP 3.2: Aufbau einer automatisierten Prozessüberwachung

Das im Arbeitspaket 3.1 optimierte Wachstumsmodell soll in Verbindung mit dem in der PhytoBoX integrierten Kontrollsystem eine automatisierte Prozessüberwachung der Mikroalgenkultivierung und der Aufbereitung des Deponiesickerwassers ermöglichen. Die Firma Nerou (ehemals Phytolinc) bietet in ihrer Anlagenplanung eine Prozessüberwachungssoftware an, in der die Modellierung implementiert werden soll. Die Firma Nerou (ehemals Phytolinc) gewährt bei Bewilligung von Phase II im Garantiezeitraum der Prozessüberwachungssoftware dafür verschiedene Serviceleistungen. Außerdem wird in diesem Arbeitspaket mit den Fachleuten der Automatisierung der TH Köln, insbesondere mit dem Arbeitskreis von Professor Wolf zusammengearbeitet. Ziel ist es, die identifizierten Wachstumsparameter zu simulieren und dadurch das Algenwachstum und die Reinigungsleistung kontrolliert zu optimieren.

#### AP 3.3: Mikroalgenkultivierung in Abwässern

Es soll untersucht werden, wie sich die Verwendung des unverdünnten Deponiesickerwassers oder anderer Prozesswässer der Abfallwirtschaft auf die Kultivierbarkeit und den Betrieb des Kultivierungssystem unter dynamischen Bedingungen auswirken. Im Vorfeld durchgeführte Studien der Universität zu Köln haben gezeigt, dass sich das membranbasierte Twin-Layer-System der Firma Phytolinc für unverdünnte, unfiltrierte Abwässer eignet (Shi, Podola and Melkonian, 2007, 2014). An diese Ergebnisse soll erstmalig in einem halbertechnischen Maßstab im Rahmen der zweiten Projektphase von ERA<sup>3</sup> angeknüpft werden.

#### AP 3.4: Prozessoptimierung und Prozessmonitoring

Die von Sensoren und Messfühlern erfassten Kultivierungsdaten werden vom Kontrollsystem der PhytoBoX aufgezeichnet und können in graphischer und tabellarischer Form abgerufen werden. Dadurch werden Laboranalysen gespart, und es eignet sich zur wissenschaftlichen Verarbeitung und Auswertung der Daten. Dies ermöglicht eine Prozessoptimierung basierend auf den während der Projektlaufzeit erhobenen Messergebnissen. Die erhobenen Daten können auf der Grundlage der o.g. Modellierung in das Steuerungssystem der Gesamtanlage integriert werden und so zur Prozessoptimierung beitragen (siehe auch Abschnitte 13.1.1 und 13.1.2).

#### AP 3.5: Langzeitkultivierung der Mikroalgen in Abwässern der Abfallwirtschaft

Der Einfluss verschiedener Kultivierungsparameter auf das Mikroalgenwachstum sowie auf die Abbaubarkeit abwasserrelevanter Inhaltsstoffe des Sicker- und Prozesswassers soll im Verlauf eines gesamten Kultivierungsjahres untersucht werden. Dabei kann der Einfluss von sich im Jahres- und Wetterverlauf verändernden Kultivierungsbedingungen geprüft werden. Hier spielen in erster Linie die Beleuchtungsdauer und -intensität, die Temperatur sowie die sich im Jahresgang verändernde Sickerwasserzusammensetzung eine Rolle. Zur Beleuchtung sollen im Jahresverlauf dimmbare, Sonnenlicht emittierende LED's als primäre Energiequelle eingesetzt werden, um möglichst realistische Bedingungen zu simulieren. Darüber hinaus soll die Veränderungen der Deponiesickerwasserzusammensetzung im Jahresgang und deren Auswirkungen auf die Kultivierbarkeit der Mikroalgen und die Abbauraten abwasserrelevanter Inhaltsstoffe untersucht werden.

#### AP 3.6: Bilanzierung der Kultivierungstechnik

Der Kostenaufwand der Anlage soll in Relation zur Reinigungsleistung sowie der Biomasseproduktion gestellt werden. Der gesamte Aufwand soll abgeschätzt werden, der nötig ist, eine definierte Biomassemenge zu produzieren und/ oder eine bestimmte Reinigungsleistung zu leisten und aufrecht zu halten. Die Kosten der Reinigungsleistung sollen mit den Kosten verglichen werden, die in einer herkömmlichen Deponiesickerwasseraufbereitung zur Reduktion abwasserrelevanter Inhaltsstoffe anfallen. Der Bergische Abfallwirtschaftsverband ist assoziierter Partner des Projektes und will die entsprechenden Daten liefern.

Zusätzlich soll der Wert der produzierten Biomasse in die Bilanzierung mit einfließen. Diese könnte beispielsweise in einer Biogasanlage verwertet werden, und so zur zirkulären Wertschöpfung beitragen. Die Analyse des biochemischen Methanpotentials der Biomasse müsste zu diesem Zweck über Literaturdaten abgeschätzt werden. Darüber hinaus soll die Reduzierung des CO<sub>2</sub>-Ausstoßes durch die litho-autotrophe Aktivität der Algen sowie die Verringerung des bei der Entsorgung hohe Kosten verursachenden Klärschlammes mit in die Bilanzierung einfließen.

#### AP 4: Potenzialabschätzung der Mikroalgenkultivierung

Zur Potentialabschätzung des Systems sollen auf der Grundlage der in Arbeitspaket 3.6 erhobenen Ergebnisse Hochrechnungen durchgeführt werden, wie groß eine Anlage in Praxis sein müsste, um welche anfallenden Sickerwassermengen der Deponie über einen Jahresgang vorreinigen zu können. Das Ziel dieser Abschätzung ist es, am Ende der Projektphase II besser beurteilen zu können, ob sich das System für eine ganzjährige, großtechnische Anlagenplanung zur Aufreinigung von Deponiesickerwasser eignet. Neben der Ökonomie eines ganzjährigen Betriebs und den damit

verbundenen Investitions- und laufenden Kosten spielen der Platzbedarf sowie rechtliche und ökologische Aspekte eine Rolle.

#### AP 4.1: Entlastungspotenzial für Deponiesickerwasser und Filtrate aus der Bioabfallvergärung

Auf der Grundlage der Bilanzierung des Systems (Arbeitspaket 3.6) soll dieses etablierten Aufbereitungssystemen gegenübergestellt werden. Durch Vergleiche mit dem Aufwand und den Kosten herkömmlicher Verfahren, die aktuell am Standort Leppe vom Bergischen Abfallwirtschaftsverband (assoziiertes Partner des Projektes) betrieben werden, kann praxisnah das Entlastungspotential abgeschätzt werden.

#### AP 4.2: Biomassepotenzial der Mikroalgenkulturen

Es soll untersucht werden, wieviel Biomasse mit dem membrangestützten Anlagensystem im Jahresgang optimal bzw. maximal produziert werden kann. Dazu sollen günstige Erntezeitpunkte gefunden werden, die ein optimales Gleichgewicht zwischen einer möglichst hohen Reinigungsleistung und möglichst hohen Biomasseerträgen ermöglichen. Im membranbasierten System muss die Biomasse mechanisch von den Membranoberflächen geerntet, getrocknet und gewogen werden. Zur Verwendung der Biomasse als Substrat bei der Biogasproduktion ist nicht nur die Quantität, sondern auch die Qualität der Zusammensetzung als möglicher Stoffwechselweginduktor entscheidend. Letzteres soll in weiteren Folgeprojekten untersucht werden.

#### AP 5: Wirtschaftlichkeitsbetrachtung

Auf der Grundlage der Betriebskosten, die mit den halbtechnischen Pilotanlagen erarbeitet wurden, soll eine techno-ökonomische Analyse des Systems über einen Jahresgang, angestellt werden. Es soll beurteilt werden, inwiefern eine Skalierung in den großtechnischen Maßstab möglich und wirtschaftlich ist. Bei der ökonomischen Betrachtung der Deponiesickerwasserklärung mit Hilfe von Mikroalgen soll neben der reinen Reinigungsbilanz auch die durch die Biomasseproduktion entstehende zusätzliche Wertschöpfung berücksichtigt werden. Die produzierte Algenbiomasse könnte beispielsweise in einem Biogasprozess zur Steigerung der Methanproduktion eingesetzt werden (Prajapati *et al.*, 2013). Dazu soll das biochemische Methanpotential der Biomasse anhand von Literaturdaten abgeschätzt werden und der finanzielle Wert der produzierten Methanmenge in die Bilanzierung einfließen. Durch Literaturrecherchen kann auch überprüft werden, ob die Algenbiomasse als Kohlenstoffquelle in einem Denitrifikationsprozess eingesetzt werden kann. An der Pilotanlage des :metabolon Standortes (HtF-SWA) könnte das in parallelen oder folgenden Projekten praxisnah untersucht werden. Auch die Verringerung des CO<sub>2</sub>-Ausstoßes, welche durch die photosynthetische CO<sub>2</sub>-Absorption der Algen erfolgt, sollte berücksichtigt werden. Die für die Mikroalgensysteme abgeschätzten Wirtschaftlichkeitsdaten sollen mit den Kosten der klassischen Methoden ins Verhältnis gesetzt und so bewertet werden.

#### AP 5.1: Eingesparte Kosten

Durch die Verwendung von Mikroalgen-Bakterien-Konsortien wird während der Nitrifikation, der Umwandlung von Ammonium in Nitrit und Nitrat, Sauerstoff eingespart, der bei der Verwendung von bakteriellen Systemen in großen Mengen zur Verfügung gestellt werden muss (Spekat, Enke and Kreienkamp, 2007; Bharagava and Chowdhary, 2018). In den ERA<sup>3</sup>-Konzepten können die Algen benötigten Sauerstoff für die Oxidation von Stickstoff liefern. Außerdem konnte in der ersten Phase von ERA<sup>3</sup> gezeigt werden, dass die Konzentrationen von Nitrit und Nitrat durch die Algenaktivität im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ohne Inokulation mit dem Mikroalgen-Bakterien Konsortium

signifikant reduziert werden. Es ist zu untersuchen, ob diese vermutlich assimilative Reduktion durch standortangepasste Mikroalgen-Bakterien-Konsortien eine Denitrifikationsstufe unterstützen oder einsparen kann und zumindest als Vorreinigungstechnik organischen Kohlenstoff (i.d.R. externe Essigsäuregaben) einspart, welcher für die Aktivität der heterotrophen Bakterien klassischer Denitrifikationsbiomasse im Überschuss zugegeben werden muss.

In diesem Bericht wurde zudem gezeigt, dass sich die Mengen an ortho-Phosphat und organischen Verbindungen (CSB) durch die Kultivierung des Mikroalgen-Bakterien-Konsortiums reduzieren ließen. Dies führt bei hoch konzentrierten Prozesswässern, die neuerdings komplementär bei der Deponiesickerwasserreinigung auch eingesetzt werden, zu einer Entlastung der biotechnologischen Prozessstufen und zu einer Nutzung der teilweise überschüssigen Mengen an Phosphat ohne verloren zu gehen (Cai, Park and Li, 2013; Richards and Mullins, 2013).

Darüber hinaus wird weniger Feststoff oder Überschussschlamm als bei einem vergleichbaren, bakteriellen Prozess produziert. Auf diese Weise können Kosten für die Entsorgung dieser Nebenprodukte eingespart werden (Spekat, Enke and Kreienkamp, 2007; Bharagava and Chowdhary, 2018).

#### AP 5.2: Verwertung von überschüssiger thermischer Energie aus BHKW's

Die Verwertung überschüssiger Energie in Form von Wärme, wie sie aus dem standorteigenen Blockheizkraftwerk des BAV als 80°C warmes Wasser zur Verfügung steht, könnte für die Beheizung der Kulturen einer Industrieanlage in den Wintermonaten eingesetzt werden. Dadurch wäre es möglich, an einem Standort wie der Leppe Deponie die Kultivierungstemperatur über das Jahr im optimalen Bereich von ca. 25-28°C zu halten. Die Abwärme könnte auch dazu genutzt werden, die Mikroalgenbiomasse vor der weiteren Verwertung als Biogassubstrat thermisch vorzubehandeln. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass ein thermischer Aufschluss im Niedertemperaturbereich (ca. 80 °C zu einer Erhöhung des biochemischen Methanpotentials der Algenbiomasse führt. Vor allem die Gattung *Chlorella sp.* ist dafür bekannt, komplexe, zellulosereiche Zellwände zu besitzen, welche einen Aufschluss nötig machen könnten (Mussnug, 2010; González-Fernández *et al.*, 2011; Passos, García and Ferrer, 2013).

## **Arbeitspaket 6.1 – Wissenstransfer**

Die erarbeiteten und hiermit für Phase I abschließend vorliegenden Ergebnisse sollen 2021 veröffentlicht werden. Mit der Veröffentlichung der an der Universität Rostock erfolgreich abgeschlossenen Masterthesis von Herrn Alexander Kuß wurde damit begonnen. Ergebnisse wurden auch im Rahmen des Treffens des KompetenzNetz UmweltTechnologie (KNUT e.V.) von Herrn David Weil, JLU Gießen, präsentiert. Weitere Maßnahmen zum Wissenstransfer werden in 2021/22 folgen.

## Fazit und Ausblick

Getrieben von der wachsenden Weltbevölkerung und einem zunehmenden Konsumverhalten steigt die Menge häuslicher Abfälle weltweit an. Die häufigste Form der Müllentsorgung ist die Einlagerung in Mülldeponien (Hoorweg, Bhada-Tata and Kennedy, 2013). Insbesondere Hausmülldeponien produzieren noch viele Jahrzehnte nach der Einlagerung von Abfällen große Mengen an Deponiesickerwasser. Dieses kann aufgrund oft hoher Konzentrationen an abwasserrelevanten Inhaltsstoffen wie Ammonium oder Phosphat zu Umweltproblemen beitragen, wenn das Deponiesickerwasser nicht gesammelt und aufbereitet wird (Kranert and Cord-Landwehr, 2010). Etablierte, bakterienbasierte Aufbereitungsverfahren erlauben bisher kaum die Rückgewinnung der im Sickerwasser enthaltenen Nährstoffe (Richards and Mullins, 2013). Zudem werden in derartigen Verfahren Kohlendioxid und Klärschlamm produziert und die Notwendigkeit von organischen Kohlenstoffquellen und technischem Sauerstoff verursacht typischerweise hohe Kosten (Spekat, Enke and Kreienkamp, 2007; Bharagava and Chowdhary, 2018).

Mikroalgenbasierte Aufbereitungssysteme haben das Potential die Aufbereitung von Deponiesickerwässern kostengünstiger und ressourcenschonender zu gestalten. Die photoautotrophen oder mixotrophen Zellen verwenden Sonnenlicht und CO<sub>2</sub> bzw. organische Kohlenstoffverbindungen und anorganische Nährstoffsalze aus den Abwässern für ihren Anabolismus. Auf diese Weise lassen sich CO<sub>2</sub> und abwasserrelevante Inhaltsstoffe in Algenbiomasse umwandeln und somit aus den Abwässern entfernen. Gleichzeitig kann die Algenbiomasse verwendet werden, um zusätzliche Wertschöpfung, beispielsweise zur Biokraftstoffproduktion, zu generieren (Liao *et al.*, 2018). Die entscheidenden Entwicklungen zur industriellen Implementierung sind jedoch bisher noch nicht vorhanden (Nawaz *et al.*, 2020). Eine zentrale Herausforderung ist es, dass Mikroalgen oder Mikroalgen-Bakterien-Konsortien aufgrund der Toxizität gewisser Sickerwasserbestandteile wie z.B. TAN, aber auch der hohen Trübung, nur selten in unverdünnten und nicht vorbehandelten Deponiesickerwässern wachsen (Lin *et al.*, 2007; Cheah *et al.*, 2016). Die Verdünnung der Sickerwässer in industrieller Größenordnung ist jedoch sowohl unter ökonomischen als auch ökologischen Aspekten nicht sinnvoll und nachhaltig.

Im Projekt ERA<sup>3</sup> konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, wiederholbar gute Wachstumsraten von bis zu 1,2 g Algenbiomasse (überwiegend von *Chlorella sp.*) pro Liter und Tag, in einer großen Bandbreite unterschiedlicher Deponiesickerwässer ohne vorherige Verdünnung oder Vorbehandlung zu erzielen (siehe Arbeitspaket 1.5). Unter den optimierten Bedingungen konnte eine Toleranz der Algen gegenüber hohen Belastungen mit wachstumshemmendem Ammonium von bis zu maximal 934 mg/L nachgewiesen werden. Außerdem wurden hohe CSB-Werte von bis zu 2076 mg/L toleriert. Die höheren Belastungen der Deponiesickerwässer führten nicht zu Wachstumseinbußen, sondern in der Regel zu höheren Algenkonzentrationen nach 15-tägiger Kultivierung. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Kultivierbarkeit weniger vom Belastungsgrad der Deponiesickerwässer, als mehr von der Optimierung der Kultivierungsbedingungen und insbesondere der Verwendung standortadaptierter Mikroalgen-Bakterien-Konsortien abhängig ist.

Gleichzeitig konnte im Arbeitspaket 2.2 (Labormaßstab) gezeigt werden, dass durch die Algeninokulation die Belastungen der Sickerwässer mit den Inhaltsstoffen Nitrit, Nitrat, ortho-Phosphat und organischen Verbindungen im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Algeninokulation signifikant reduziert werden ( $p < 0,05$ ). Die Inokulation der Sickerwässer mit dem standortangepassten Mikroalgen-Bakterien Konsortium führte im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Algeninokulation aber nicht zu einer Reduktion der Ammoniumkonzentrationen.



Im Arbeitspaket 2.3 wurde die Skalierbarkeit für das verfahrenstechnische Upscale untersucht. Es wurde festgestellt, dass bei der Verwendung höherer Volumina die Lichtverfügbarkeit unter den gegebenen Versuchsbedingungen zu einer Wachstumslimitierung führt. Dieser Herausforderung wurde mit einer membranbasierten Kultivierungsstrategie begegnet. Hier wurde qualitativ ein wesentlich besseres Algenwachstum festgestellt als in den suspensionsbasierten Systemen, was insbesondere auf die bessere Lichtverfügbarkeit der an der Wasseroberfläche schwimmenden Membranen zurückgeführt wurde. Außerdem konnten unter diesen Bedingungen die Ammonium- und Phosphatkonzentrationen in Kulturen mit Algenwachstum im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ohne Algenwachstum, innerhalb des 15-tägigen Kultivierungszeitraumes, bis auf Indirekteinleiterkriterien reduziert werden (AbwV, 2016).

Aufgrund dieser Ergebnisse wird für die zweite Phase des Projektes ein an der Universität zu Köln entwickeltes, membran-basiertes „Twin-Layer-System“ für den Pilotmaßstab vorgeschlagen, welches von der Firma Phytolinc entwickelt wurde. Dieses soll für den spezifischen Anwendungszweck der Deponiesickerwasseraufbereitung angepasst werden. In diesem System sind Algen und Sickerwasser räumlich voneinander getrennt. Diese Immobilisierung der Algen soll insbesondere eine bessere Lichtausbeute bei der Verwendung stark eingetrübter Sickerwässer ermöglichen. Darüber hinaus konzentriert sich die Algenbiomasse in den Biofilmen auf natürliche Weise, wodurch der Ernteprozess wesentlich erleichtert- und gleichzeitig eine Rückhaltung der Biomasse außerhalb des Sickerwassers gewährleistet wird (Johnson and Wen, 2010).

Auf dieser Grundlage soll in einer Phase II erforscht werden, ob es möglich und konzeptionell unter verschiedensten Aspekten der Wirtschaftlichkeit und der Nachhaltigkeit sinnvoll ist, eine der beiden mikroalgenbasierten Deponiesickerwasseraufbereitungsanlagen als Ergänzungsstufe an der Deponie Leppe oder ähnlichen Standorten zu etablieren. Es soll herausgearbeitet werden, unter welchen Bedingungen welcher Anlagenart der Vorzug gegeben werden sollte. Als besonderen Vorteil zu anderen Studien bietet die Fortführung von ERA<sup>3</sup> in Phase II sowohl die Einbindung der Mikroalgenkultivierung in das interdisziplinäre Forschungskonzept :metabolon als auch den Support des Deponiebetriebs des Bergischen Abfallwirtschaftsverbandes. Dies bietet bei überzeugenden Ergebnissen die erstrebenswerte Gelegenheit, eine mikroalgenbasierte Wasseraufbereitung nahtlos in den technischen Deponiebetrieb zu transferieren.

# Anhang

## Material und Methoden

Im Folgenden werden die Materialien und Methoden vorgestellt, die in den Versuchen von ERA<sup>3</sup> Phase I zum Einsatz gekommen sind. Der im Folgenden dargelegte Material- und Methodenteil entspricht den Vorgaben nach Annesley (Annesley, 2010).

## Materialien

### Instrumente und Laborequipment

Tabelle 14: Liste der verwendeten Instrumente

Instrument	Hersteller	Modell
Zentrifuge	Hermle	Z326K
Magnetrührer	Heidolph Instruments, Schwabach, Germany	MR 3001 K
Photometer	Hach Lange	DR6000
pH-meter	WTW	Multi 363IDS
pH-meter-Electrode	WTW	Sentix 41
Konduktivitäts-Sonde	WTW	Tetracon925
Wage	Kern	ACJ/ACS
Gaschromatographie	ThermoScientific	Trace 1310
Luftpumpe	Eheim	Air pump 400
Küvettestest NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	Hach-Lange	LCK303
Küvettestest NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N	Hach-Lange	LCK342
Küvettestest NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	Hach-Lange	LCK340
Küvettestest COD	Hach-Lange	LCK514
Küvettestest PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	Hach-Lange	LCK349
Quantummeter	Apogee Instruments, Inc.; 721 West 1800 North Logan, UT 84321 USA	MQ-210
Quantum sensor	Apogee Instruments, Inc.; 721 West 1800 North Logan, UT 84321 USA	500-series
LED's	Bioledex	LFL-25RB-373
Cell-counting-chamber	Marienfeld	Improved Neubauer
Microskop	Zeiss	Axio Lab.A1
Mikroskop-Kamera		
Trockenofen	Memmert	UN 55
Muffelofen	Heraeus	T5028

## Software, Datenbanken und verwendete Programme

Tabelle 15: Liste der angewendeten Software

Quelle	Beschreibung
Google Scholar	Literatursuche
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	Literatursuche
IBM SPSS	Statistische Analyse
MS Office	Software zur Text- und Datenverarbeitung
Sketchup	CAD-Software
Autocad	CAD-Software
Light Analysts, Inc -AGI32	Software zur Lichtsimulation

### Statistische Analysen

Zur statistischen Analyse wurde SPSS verwendet: T-Test und U-Test (Mann-Whitney-Test) wurden verwendet, um statistisch signifikant Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen der Wachstums- und Abbauversuchen nachzuweisen.

### Organismen

Das in diesem Projekt verwendete Mikroorganismen-Konsortium wurde in Voruntersuchungen aus dem Sickerwasser der Deponie „Leppe“ in Lindlar entnommen. Dazu wurden an verschiedenen Stellen Sickerwasserproben entnommen, in denen die Algen auf natürliche Weise vorkamen (Korrespondenz mit Dr. P. Beese-Vasbender; BAV). Die Algen wurden zunächst in Suspensionskulturen herangezogen, wobei das Deponiesickerwasser als Medium verwendet wurde. Dabei wurden Lichtintensitäten von ungefähr  $150 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  und Temperaturen von  $22 \text{ }^\circ\text{C}$  verwendet. Die Organismen wurden mikroskopisch bei 400 bis 1000 facher Vergrößerung morphologisch untersucht. *Chlorella* sp. wurde als dominantes Genus identifiziert.

### Kulturmedien

Die vier verschiedenen in diesem Projekt verwendeten Sickerwässer wurden von den Deponien in Lindlar (zwei verschiedene Entnahmepunkte: „Reservoir 1“ und „DA 4/5“), Aßlar (Hessen) und Riskirchen (Hessen) erhalten. Nach der Entnahme wurden die physikochemischen Eigenschaften nach Literaturstandard (Vandenbroucke and Largeau, 2007) ermittelt. Die gefundenen Wasserparameter sind in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16 Relevante Wasserparameter der verwendeten Deponiesickerwässer

	LL from DA4/5. Leppe	LL from Reservoir 1. Leppe	LL from landfill in Aßlar	LL from landfill in Reiskirchen
pH	8.07	8.298	8.303	7.528
Temperature [°C]	10.5	11.3	12.8	10.1
Conductivity [S/m]	15.98	8.77	9.55	7.41
O <sub>2</sub> [mg/L]	0	0	0	0.1
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> - N [mg/L]	908	466	496	244
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> - N [mg/L]	1.08	0.233	1.32	0.003
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> - N [mg/L]	10.5	3.62	6.42	6.98
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> - P [mg/L]	4.44	2.1	6.94	1.42
COD [mg/L]	2042	789	1046	476

Die in den Sickerwässern vorkommende Mikroorganismenflora wurde nach der Entnahme und nach 20 tägiger Kultivierung mikroskopisch charakterisiert. Die Ergebnisse sind in AP 1.2 auf Seite 13 dargestellt.

Vor der Verwendung als Medium wurden die Sickerwässer in luft- und lichtdichten Plastikkanistern bei Raumtemperatur für wenige Tage aufbewahrt, da es keine Möglichkeit gab, die großen Mengen zu kühlen. Um eine möglichst homogene Durchmischung der Sickerwässer bzw. der darin enthaltenen Partikel zu gewährleisten, wurden die Kanister vor jeder Entnahme stark geschüttelt.

Im Folgenden werden die Entnahmepunkte und Merkmale der verschiedenen Sickerwässer beschrieben.

#### Sickerwässer der Deponie Leppe

Die Deponie „Leppe“ in Lindlar wurde als so genannte Taal-Einschluss-Deponie erbaut. Sie umfasst eine Gesamtfläche von 450.000 m<sup>2</sup> und besitzt eine Ablagekapazität für ungefähr 8,9 Millionen Tonnen Abfall. Sie ist in 7 Deponieabschnitte (DA's) eingeteilt. DA 1-7 wurde vor allem für Haushaltsabfälle (Klasse 2) konzipiert, von denen 6 bereits geschlossen bzw. in der Nachsorgephase sind. In Abschnitt 6.1 wurden ausschließlich inerte Abfälle deponiert (Klasse 1) und in Abschnitt 7.1 ausschließlich Böden. Ein Lageplan der verschiedenen Deponieabschnitte ist in Abbildung 38 dargestellt. Im Jahr fallen durchschnittlich 200.000 m<sup>3</sup> Deponiesickerwasser an. Diese sind je nach Entnahmepunkt insbesondere durch hohe Konzentration an organischen Verbindungen und Ammonium-Stickstoff gekennzeichnet.

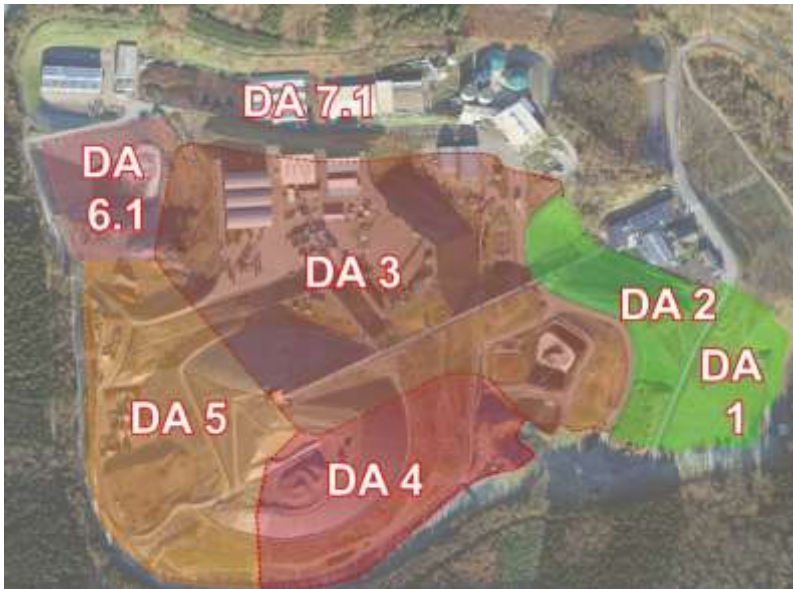


Abbildung 38: Lageplan der Deponie Leppe in Lindlar mit Deponieabschnitten ((Steiner, 2019)

Die Sickerwässer der Deponie Leppe wurden an zwei unterschiedlichen Entnahmepunkten entnommen.

(1) Entnahmepunkt 1: Deponieabschnitt 4/5 (DA 4/5)

Dieses Sickerwasser zeichnete sich dadurch aus, dass es nach dem Eindringen in den Deponiekörper keinen direkten Kontakt zu Sonnenlicht hatte. Hier wurden die höchsten Anfangskonzentrationen an organischen Verbindungen, an Nitrit-, Nitrat- und Ammonium-Stickstoff aller untersuchter Sickerwässer gemessen.

(2) Entnahmepunkt 2: „Reservoir 1“

Hierbei handelt es sich um ein Konglomerat der Sickerwässer aller Deponieabschnitte (DA 1 – DA 7), welches in einem Freiluftbecken zwischengelagert wird, bevor es der Sickerwasseraufbereitung zugeführt wird. Das Rohsickerwasser zeichnete sich durch vergleichsweise moderate Konzentrationen aller betrachteten abwasserrelevanten Inhaltsstoffe aus.

### Sickerwässer der Deponie Aßlar

Die Deponie Aßlar wurde im Jahr 1975 zugelassen und erstreckt sich über eine Fläche von ca. 540,6 ha, von denen auf etwa 27 ha ca. 8 Millionen m<sup>3</sup> Abfall abgelagert werden dürfen. Bis 2005 wurden überwiegend Haushalts- und Industrieabfälle (Klasse 2) eingelagert. Nach der Verabschiedung des Abfallgesetzes von 2005 wurden nur noch vorbehandelte Abfälle (Rostasche) eingelagert (Landschaft, 2010). Eine Übersicht über die verschiedenen Sickerwasser-Entnahmeschächte ist in Abbildung 39 zu sehen. Im Bereich des Sammelschachtes wird das gesamte Sickerwasser der Deponie sowie das Abwasser einer deponieeigenen Kompostierungsanlage zusammengeführt, bevor das Wassers zur Abwasseraufbereitungsanlage weitergeleitet wird. Die hier jährlich anfallenden Abwassermengen betragen zwischen 100.000 und 200.000 m<sup>3</sup> pro Jahr (Landschaft, 2010).

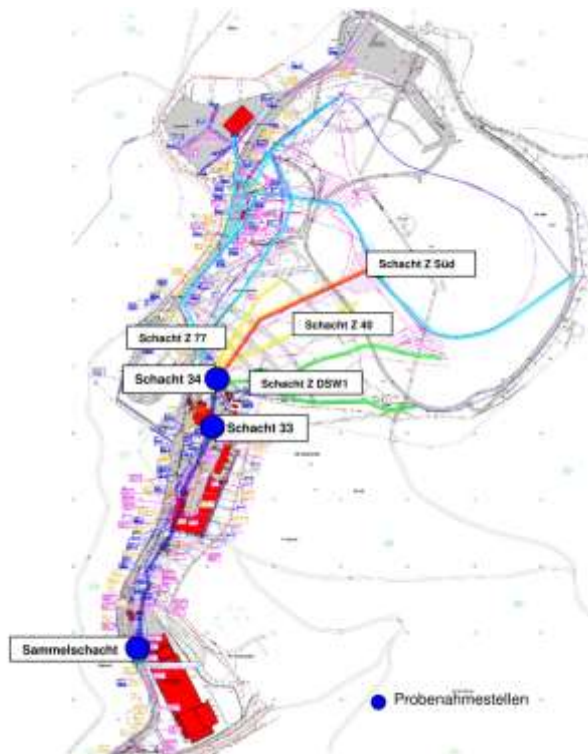


Abbildung 39: Lageplan der Deponie in Aßlar mit Sickerwasserentnahmestellen (Landschaft, 2010)

Die in dem Projekt verwendeten Sickerwässer wurden aus dem Sammelschacht (siehe Abbildung 39) entnommen. Es handelt sich somit nicht um reines Deponiesickerwasser sondern um eine Mischung mit Abwasser einer Kompostierungsanlage. Dieses Wasser zeichnete sich durch eine vergleichsweise hohe Trübheit sowie hohe Konzentrationen an organischem Material und die höchsten Phosphat-Phosphor-Konzentrationen aller Sickerwässer aus.

### Sickerwasser der Deponie Reiskirchen

Die Deponie in Reiskirchen wurde im Jahre 1973 als Verdichtungsdeponie auf einer ehemaligen Kalksteindeponie ohne Basisabdichtung errichtet. Sie entspricht in Übereinstimmung mit den damaligen Richtlinien nicht dem heutzutage gängigen Multibarrierenkonzept. Bis 2001 wurden hier etwa 2,3 Millionen m<sup>3</sup> Abfälle auf einer Fläche von ca. 10 ha eingelagert. Vor allem Haushalts- und Industrieabfälle (Klasse 2), aber auch Baumischabfälle und Erde (Klasse 0) wurden verfüllt. Vor der Einlagerung wurden viele Abfälle zerkleinert. Seit 2001 befindet sich die Deponie in der Nachsorgephase.

Ein Überblick über die verschiedenen Segmente ist in Abbildung 40 dargestellt. Die Sickerwässer aller Segmente werden gemeinsam in einer Wasseraufbereitungseinrichtung aufbereitet.



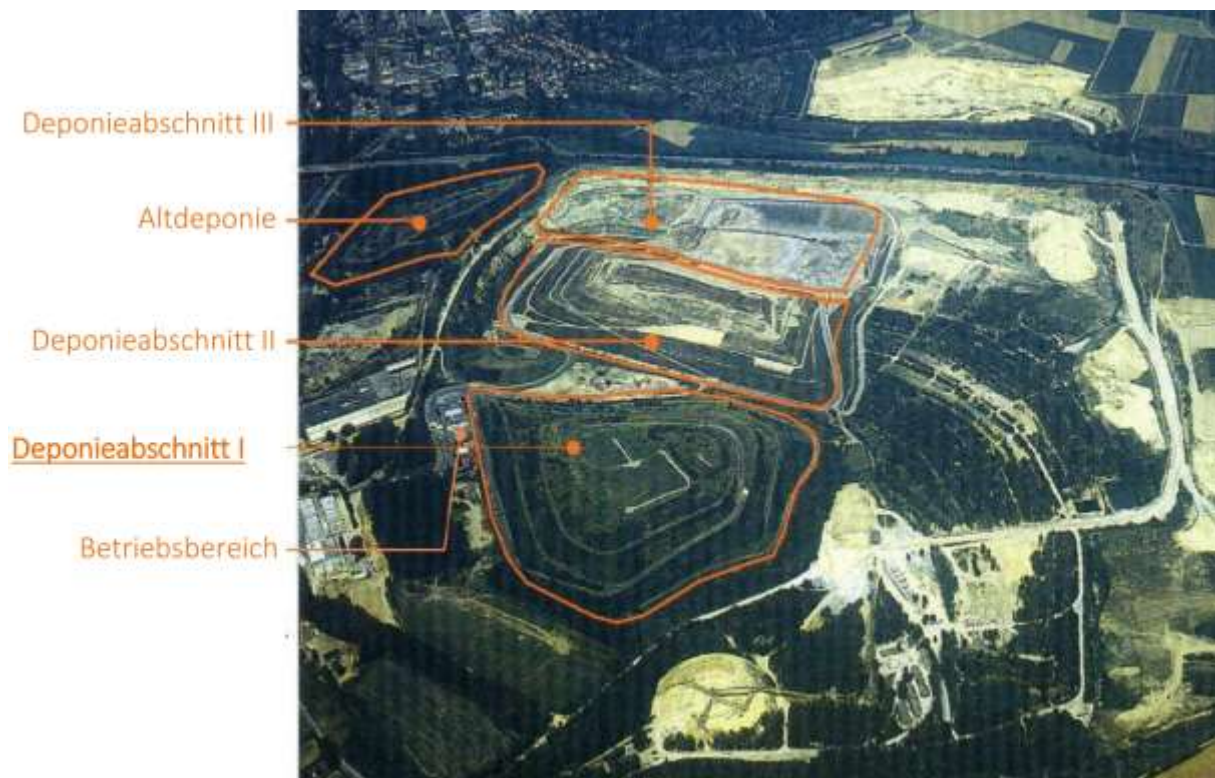


Abbildung 40: Die Deponie Reiskirchen und ihre verschiedenen Segmente aus der Vogelperspektive (Zorbach, 2014)

Das für die Experimente verwendete Sickerwasser wurde aus der Sickerwasseraufbereitungsanlage entnommen. Aufgrund des hohen Alters der Deponie sind die Konzentrationen an suspendierten Partikeln, organischem Material und der Ammonium-Stickstoff-Gehalt vergleichsweise gering.

## Methoden

### Analytische Methoden

#### Bestimmung der Kultivierungsparameter

Zur Bestimmung der Kultivierungsparameter wie pH-Wert, Konduktivität, Sauerstoffkonzentration und Temperatur wurden sowohl in den Rohsickerwässern als auch während der Experimente in den Suspensionskulturen ein Multimeter und entsprechende Elektroden verwendet (siehe auch Tabelle 14). Vor der pH-Wert-Messung wurde eine 3-Punkt-Kalibration mit pH 4, pH 7 und pH 10 Standards durchgeführt. Zur Messung der Konduktivität wurde mit einem 1413  $\mu\text{S}/\text{cm}$  Standard bei 22°C kalibriert.

#### Bestimmung der Mikroalgenkonzentrationen und der Wachstumsraten

Zur Korrelation der Wachstumsraten wurden drei Kulturen nach Abbildung 41 aufgebaut unter den Bedingungen kultiviert, wie Sie im Material und Methoden – Teil, unter Arbeitspaket 1.5 ab Seite 85 bereits beschrieben wurden.

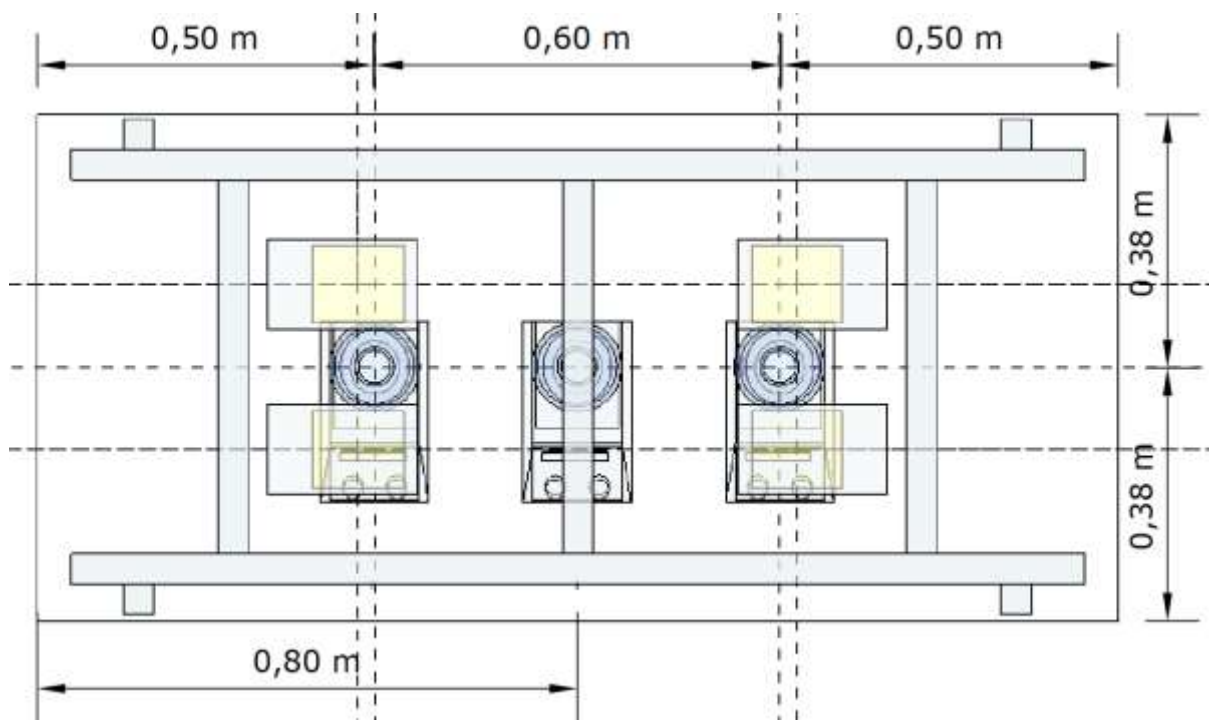


Abbildung 41: Versuchsaufbau für Vorversuche und Vorkultivierung der isolierten, standortangepassten Mikroalgen

Die Wachstumsraten einer Algenkultur können durch die Zellkonzentration, das Trockengewicht, die optische Dichte und andere Parameter beschrieben werden. Die photometrische Messung der optischen Dichte wurde als schnelle und zerstörungsfreie Methode eingesetzt, um die Zellzahl und die Trockensubstanz der Suspensionskulturen indirekt zu bestimmen. Dazu wurden die gemessenen Absorptionswerte mit der Zellzahl, dem Trockengewicht und den flüchtigen suspendierten Feststoffen korreliert. Es wurden Standardkurven erstellt indem Messpunkte in regelmäßigen Abständen und in Dreifachbestimmung eines gesamten Wachstumszyklus einer Algenkultur aufgenommen wurden.

Die Messungen der optischen Dichte wurde nach Griffiths (Griffiths *et al.*, 2011) durchgeführt. Die Proben wurden täglich kurz vor Beginn des Licht-Zyklus genommen. Wenn nötig wurden die Proben verdünnt, um in den durch das Lambert-Beersche-Gesetz definierten linearen Bereich der Extinktion ( $OD < 1$ ) zu fallen. Der Verdünnungsfaktor wurde bei den Auswertungen berücksichtigt. Die photosynthetische Aktivität wurde im Absorptionsbereich von Chlorophyll b bei 680 nm gemessen. Die Zellzahl wurde nach Guillard (Guillard and Sieracki, 2005) mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer gemessen (siehe Abbildung 42).



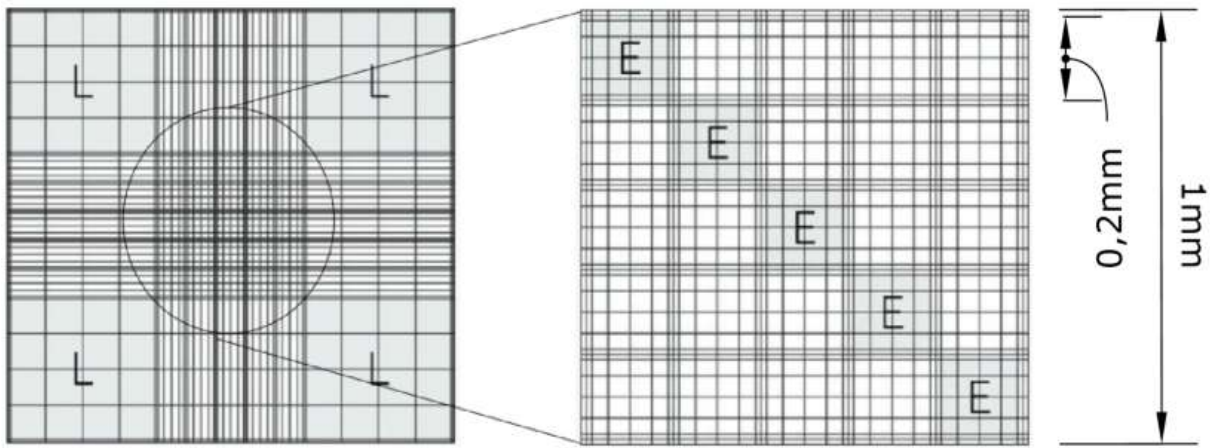


Abbildung 42: Improved-Neubauer Zählkammer (Source: VWR International, 2019)

Bei 100-facher Vergrößerung wurden 5 der 25 „E-Quadrate“ in Doppelbestimmung ausgezählt. Zellen, die außerhalb der Quadrate lagen, wurden nur dann mitgezählt, wenn Sie die obere oder linke Linie des Quadrates berührten. War der Fehler zwischen zwei Zählungen einer Doppelbestimmung mehr als 10%, wurde die Zählung mit einer neuen Probe derselben Kultur wiederholt. Überstieg die Zellzahl 50 Zellen pro Quadrat, wurde die Probe verdünnt und die Zählung wiederholt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Cell number [Cells/mL]} = \frac{(\text{average cell number in } 0.00025\text{mm}^3) * 4 * 10^{-6} * (\text{dilution})}{\text{mL}}$$

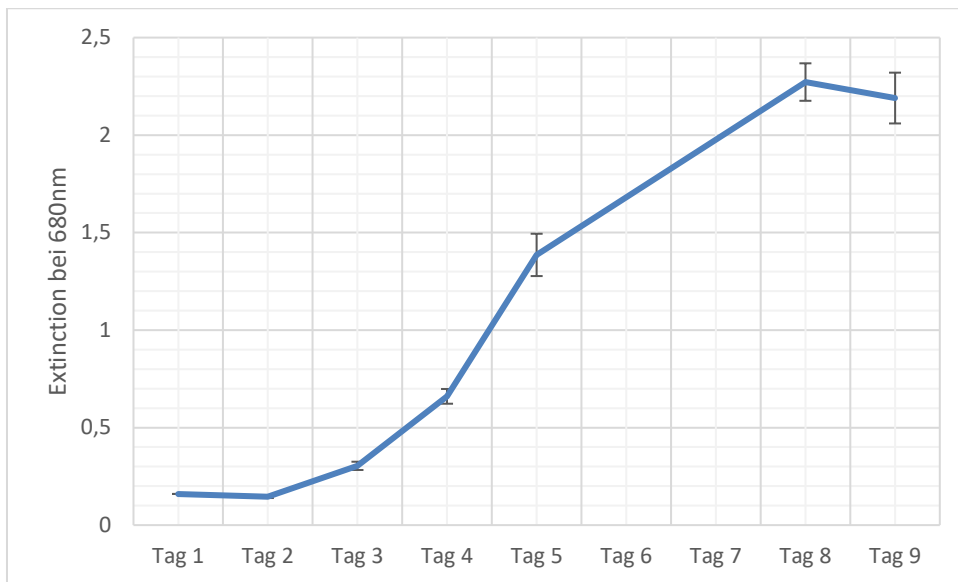
**Formel 2: Extrapolation der Gesamtzellzahl durch Messung mit einer Neubauer Zellzählkammer in einem definierten Volumen**

Der Feststoffgehalt (TS) und der Anteil flüchtiger Feststoffe wurde nach Cybulski (Cybulski *et al.*, 2017) bestimmt. Der TS wurde durch Filtration von 20 mL Probe in Doppelbestimmung gemessen. Dazu wurde ein vorgewogener 0,45 µm Cellulose-Nitratfilter verwendet. Dieser wurde bei 105°C bis zur Massekonstanz getrocknet. VS wurde über den Glühverlust als Differenz zum TS berechnet. Der Glühverlust wurde bei 550°C für eine Stunde in einem Muffelofen ermittelt. Um den reinen TS und VS des Rohsickerwassers von den Messungen abziehen zu können, wurde dieser Prozess mit Rohsickerwasser ohne Algen wiederholt.

Die Ergebnisse wurden gegen die optische Dichte bei 680 nm aufgetragen.

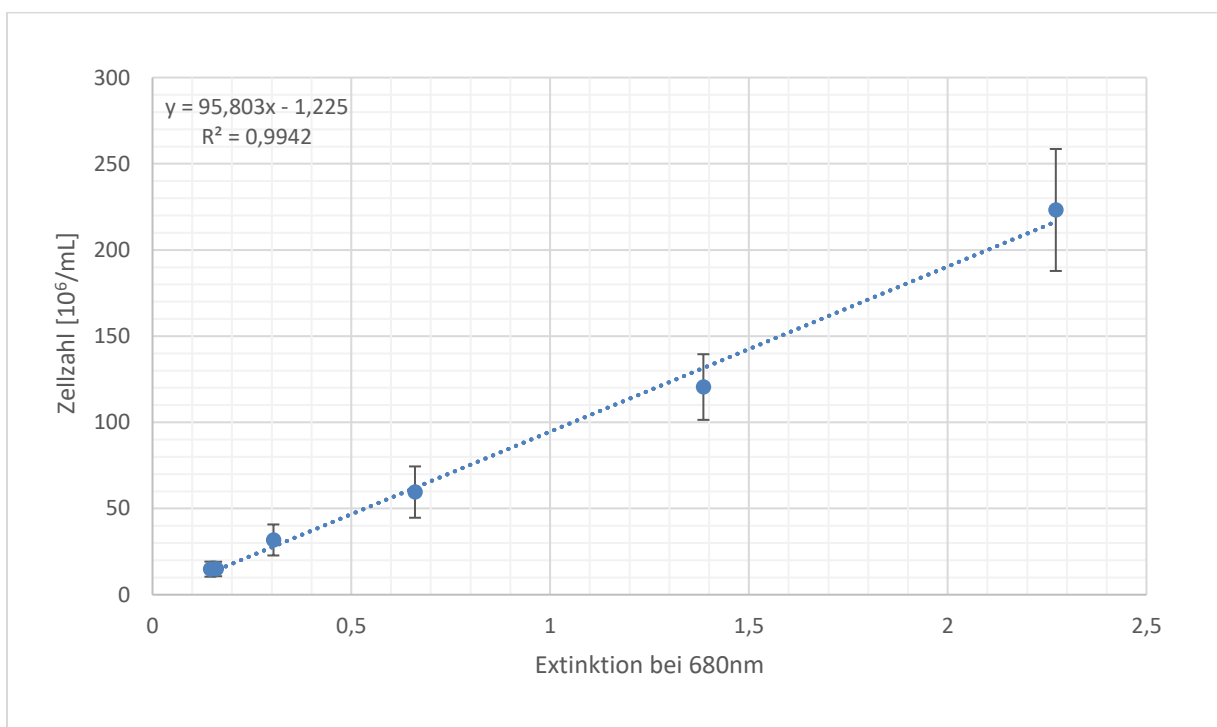
Korrelation der optischen Dichte mit der Trockensubstanz, der Zellzahl und der Menge flüchtiger organischer Bestandteile

Zur Korrelation der gemessenen optischen Dichte (Extinktion) mit der Zellzahl, TS und VS wurden Standardkurven innerhalb eines gesamten Kultivierungszyklus in Dreifachbestimmung angefertigt.



**Abbildung 43: Wachstumskurve einer Mikroalgenkultur als Messung der optischen Dichte bei 680 nm, aufgetragen gegen die Kultivierungszeit.**

Es wurde eine lineare Korrelation sowohl zwischen der OD und der TS, zwischen der OD und VS als auch zwischen der OD und der Zellzahl gefunden (siehe Abbildung 44, Abbildung 45).



**Abbildung 44: Standardkurve als Extinction bei 680nm, aufgetragen gegen die Zellzahl einer Mikroalgenkultur, kultiviert in Deponiesickerwasser der Deponie Lepe (Reservoir 1)**

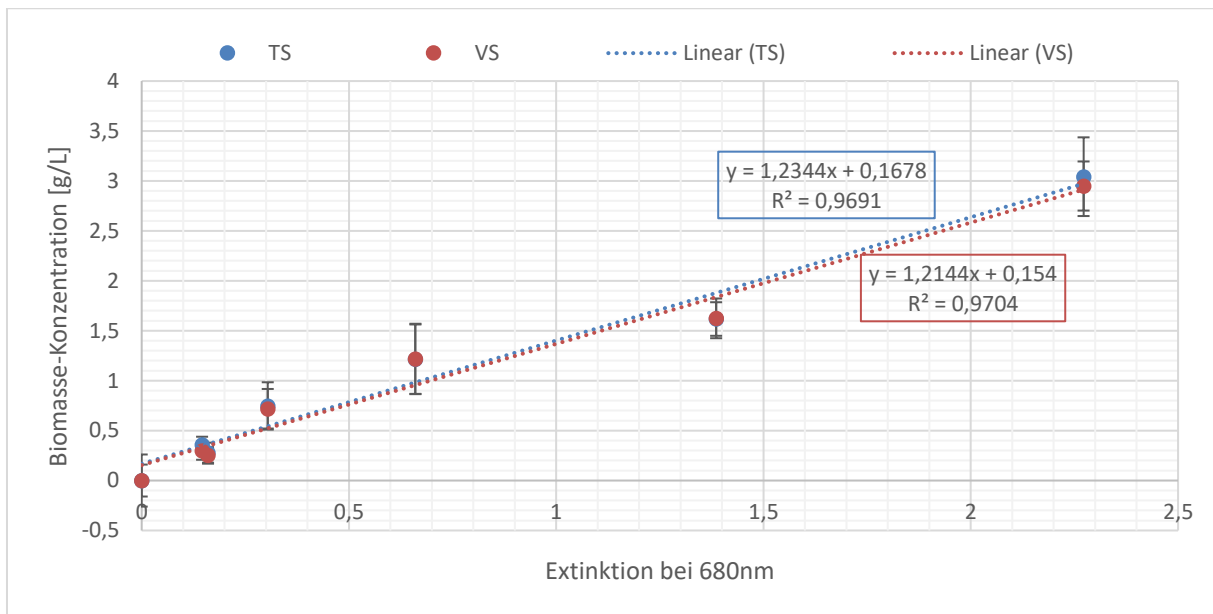


Abbildung 45: Standardkurve als Extinktion bei 680 nm, aufgetragen gegen die Biomassekonzentration und die Konzentration (TS) flüchtiger organischer Bestandteile (VS) einer Mikroalgenkultur, kultiviert in Deponiesickerwasser der Deponie Leppa (Reservoir 1)

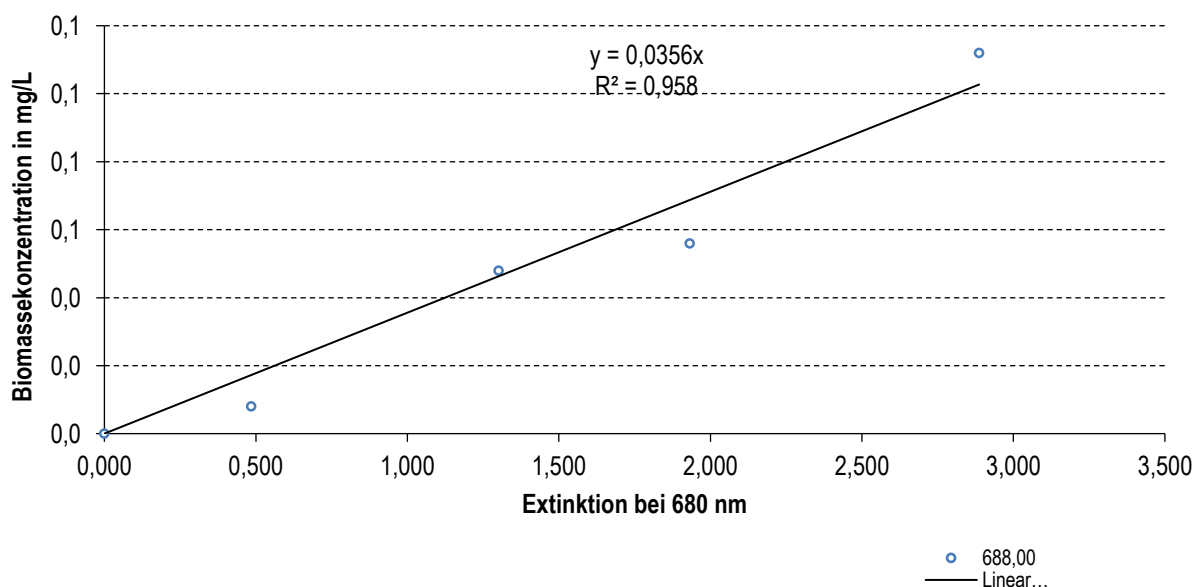


Abbildung 46: Regression zwischen den gemessenen Extinktionswerten und den Biomassekonzentrationen in den Versuchsreihen für Temperatur, Licht und pH-Wert; Arbeitspaket 2.1

### Bestimmung der Konzentrationen abwasserrelevanter Inhaltsstoffe

Zur Messung der  $\text{NH}_4^+$ -N,  $\text{NO}_2^-$ -N,  $\text{NO}_3^-$ -N,  $\text{PO}_4^{3-}$ -P Konzentrationen und des CSB-Wertes wurden Hach Lange Küvetten-Tests verwendet. Vor der Durchführung der Tests wurden die suspendierten Partikel durch Zentrifugation bei 4500 U/min für 30 Minuten und anschließende Filtration durch einen 45  $\mu\text{m}$  Membranfilter entfernt. Die Tests wurden nach den Vorschriften des Herstellers durchgeführt (Hach-Lange, 2019). Bei Bedarf wurden die Proben entsprechend des vorgegebenen Messbereichs verdünnt. Die Konzentrationen von  $\text{NH}_4^+$ -N,  $\text{NO}_2^-$ -N,  $\text{NO}_3^-$ -N,  $\text{PO}_4^{3-}$ -P und COD wurden jeweils an den Tagen 1, 8 und 15 des 15-tägigen Versuchszeitraumes gemessen.

Tabelle 17: Verwendete Küvetten-Tests (Hach-Lange, 2019)

Produkt code	Parameter	Messbereich [mg/L]	Methode	Quelle
LCK 303	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	2-47	Indophenol-blue	ISO 7150-1, DIN 38406 E5-1, UNI 11669:2017
LCK 342	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N	0,6-6	Diazotization	EN ISO 26777, DIN 38405 D10
LCK 340	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	5-35	2,6- Dimethylphenol	ISO 7890-1-2-1986, DIN 38405 D9-2
LCK 349 LCK 350	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> -P	0,05-1,5 2,0 – 47,0	Phosphorus molybdenum blue	ISO 6878-1-1986, DIN 38405 D11-4
LCK 514	COD	100-2000	Dichromat	ISO 6060-1989, DIN 38409-H41-H44
LCK 228	Kalium	5 – 50 mg/L	Kalignost	-

## Versuchsaufbau der Arbeitspakete

Im Folgenden wird der Versuchsaufbau der einzelnen Arbeitspakete vorgestellt. Die erste Projektphase von ERA<sup>3</sup> war ein Kooperationsprojekt von der TH-Köln und der Universität Gießen. Dem Arbeitsplan entsprechend, wurden die Arbeitspakete 1.1 (Isolierung und Kultivierung der standortangepassten Mikroalgen), 1.2 (Mikroskopische Charakterisierung), 1.3 (Physiologische Charakterisierung), 1.4 (Chemische Taxonomie) sowie 2.1 (Parameterabhängige Wachstumstumsraten) an der Universität Gießen durchgeführt.

Die Arbeitspakete 1.5 (Kultivierung der angepassten Algen in verschiedenen Deponiesickerwässern) und 2.3 (Biomassebildung unter variierenden Kultivierungsbedingungen) wurden an der TH-Köln erarbeitet. AP 2.3 wurde, anders als geplant, nicht an der Universität Gießen, sondern an der TH-Köln durchgeführt. Der Grund dafür war, dass für die Versuche im Pilotmaßstab, größere Mengen (insgesamt etwa 1 Kubikmeter) Sickerwasser benötigt wurde. Das auf dem Grundstück der Deponie Leppe gelegene Forschungsinstitut Metabolon der TH-Köln ermöglichte durch die enge infrastrukturelle Vernetzung mit dem Bergischen Abfallwirtschaftsverband an diesem Standort, direkten Zugang zu dem Sickerwasser. Bei einer Durchführung an der Universität Gießen wären hierfür regelmäßige, aufwendige Transporte nötig gewesen.

Arbeitspaket 2.2 wurde an beiden Standorten durchgeführt. Auch die Arbeitspakete 2.4 (Analytik), 3 (Zwischenbericht), 4 (Vorplanung der halbtechnischen Pilotanlage und 5. (Wissenstransfer) wurden gemeinsam erarbeitet.

### AP. 1.1 (Universität Gießen)

Es wurden Sickerwasserproben an unterschiedlichen Stellen auf dem Gelände der jeweiligen Deponien (Tabelle 3) entnommen und im Labor für 20 Tage bei 25 °C, kontinuierlicher Belüftung und 12 h Beleuchtung pro Tag in 500ml Gaswaschflaschen inkubiert.

In einer Gaswaschflasche wird die Algensuspension über eine Glasröhre belüftet. Überschüssige Luft kann über eine zweite Glasröhre wieder entweichen. Um die Verdunstung zu minimieren, ist am Ende der Auslassröhre eine mit Watte gefüllte Spritze befestigt, welche als Kondensationsfalle dient. Beide Glasröhren sind über einen Gummistopfen an der Flasche befestigt. Die erfolgreich zur Isolierung und Anzucht eingesetzte, neu erarbeitete Technik ist im Ergebnisteil ab der Seite 12 erläutert.

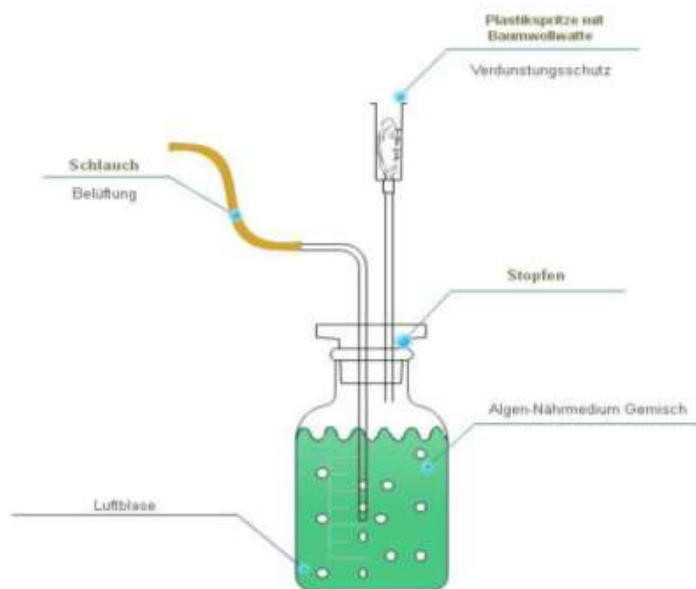


Abbildung 47: Schematische Darstellung der Versuchsanätze.

### AP 1.2 (Universität Gießen)

Als Mikroskop diente das Stereomikroskop von LEICA M205 C, dessen Zoom-Bereich von 7,8x bis 160x reicht. Die Aufnahmen zur Analyse im Sickerwasser wurden bei 400-facher Vergrößerung durchgeführt. Die Methodische Etablierung ist im Ergebnissteil genauer beschrieben (siehe Abschnitt 1.2, ab Seite 13).

### AP 1.3 (Universität Gießen)

Siehe Ergebnissteil (Abschnitt 1.3, ab Seite 14)

### AP 1.4 (Universität Gießen)

In diesem Arbeitspaket wurden Versuche zur methodischen Etablierung der Charakterisierung auf genetischer Ebene eingeführt. Der Zellaufschluss zur DNA-Extraktion erfolgte nach den Arbeiten von Lee et al. (2010) durch Bead-Beating unter Zugabe von Lysepuffer in 20 µl Röhrchen für 10 min (Lee *et al.*, 2010). Im Anschluss wurden die Proben mit Proteinase K (Qiagen) für zwei Stunden bei einer Temperatur von 65°C inkubiert. Die neu erarbeitete Methodik wird im Ergebnissteil ab Seite 15 erläutert.

### AP. 1.5 (TH-Köln)

Die bei den Versuchen verwendeten Materialien sowie analytische Methoden sind im Abschnitt „Material und Methoden“ ab Seite 73 dargestellt.

Um die Wachstumsraten der Mikroalgen sowie die Abbauraten abwasserrelevanter Inhaltsstoffe zu untersuchen, wurden zwei Versuche unter kontrollierten Laborbedingungen durchgeführt. Die grundlegenden Kultivierungsbedingungen sind in Tabelle 18 gegeben. Dazu wurde ein Laborabzug an den Innenseiten mit reflektierender Folie ausgekleidet, um die Lichtabsorption der Wände zu verringern. Die Temperatur wurde durch die Klimaautomatik konstant bei 22°C gehalten. In allen Kulturen wurden 12 x 1 L Erlenmeyerkolben als Kultivierungsgefäße verwendet. Das Sickerwasser, welches als Medium verwendet wurde, wurde in den Inokulationskulturen vor den Versuchen mit dem Mikroalgen-Bakterien-Inokulum vermischt und unter ständigem Rühren auf die Erlenmeyerkolben aufgeteilt, um eine homogene Verteilung zu gewährleisten.

**Tabelle 18: Grundlegende Kultivierungsbedingungen der Laborkulturen**

Parameter	Werte
Durchschnittliche Beleuchtungsintensität [ $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ]	150 - 200
Hell-/Dunkel-rythmus [h]	14/10
Temperatur [°C]	22
pH	6,5 – 7
Rührgeschwindigkeit [R/min]	150
Begasungsrate [Luftblasen/min]	90
CO <sub>2</sub> Gehalt im Gas [%]	5-10
Durchschnittliche Anfangs-Inokulation [g/L]	0,8
Batch-Volumen (Erlenmeyerkolben) [L]	1
Medium	Unverdünnte, unvorbehandelte Sickerwässer

Die Kulturen wurden auf magnetische Rührplatten gestellt und mit 3,5 cm langen Magnetrührern bei 15-200 U/min gerührt. Der pH-Wert wurde in allen Versuchen, mit Hilfe einer permanenten Mischbegasung (CO<sub>2</sub> (5-10%) / Umgebungsluft (90-95%)) auf 6,5 – 7 eingestellt, v.a. um eine Ausgasung von TAN zu verhindern. Eine exemplarische Abbildung der verwendeten Suspensionskulturen ist in Abbildung 48 gezeigt.

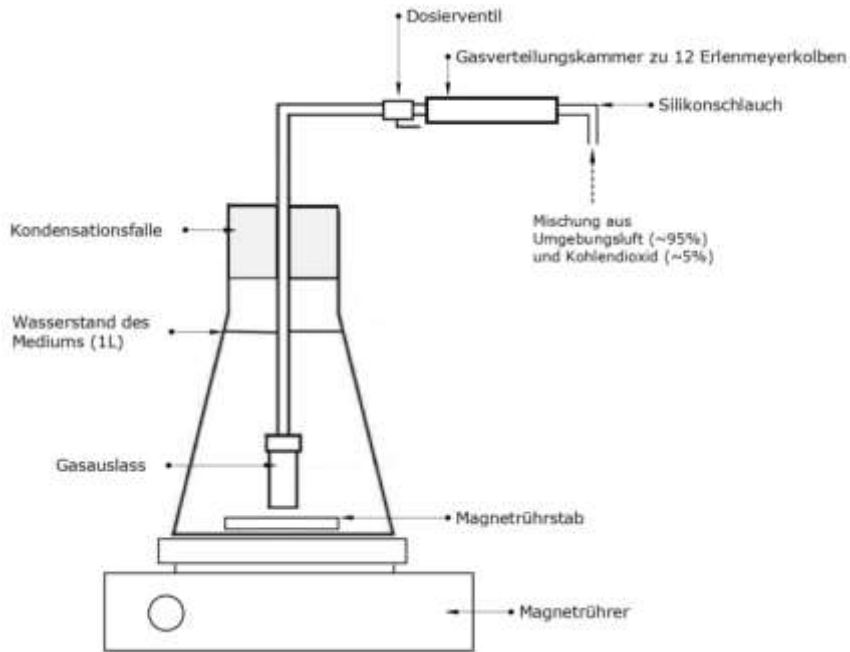
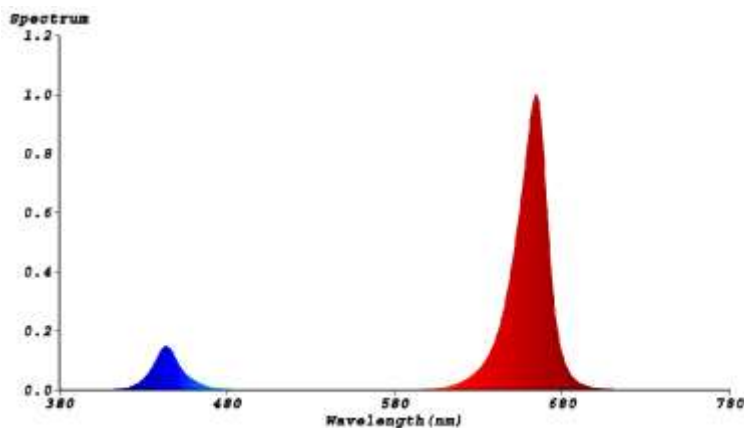


Abbildung 48: Schematische Zeichnung einer Erlenmeyerkollben-Laborkultur mit Begasung

Alle Kulturen wurden mit einer Start-Extinktion (bei 680 nm) von ca. 0,5 inokuliert, was einer Trockensubstanz von ca. 0,8 g/L oder  $45 \cdot 10^6$  Zellen/mL entspricht. Die Korrelation von Extinktion, Trockensubstanz und Zellzahl ist im Anhang ab Seite 80 dargestellt. Die Position der Kulturen wurde randomisiert, um eine möglichst willkürliche Verteilung der Kultivierungsbedingungen zu gewährleisten. Zur Beleuchtung wurden LED's (Bioledex GoLeaf LFL-25RB-37) verwendet, deren Spektrum und Eigenschaften in Abbildung 49 dargestellt sind.



Manufacturer	Bioledex
Model	LFL-25RB-373
CRI-Value [Ra]	9
PPF-Value [ $\mu\text{mol/s}$ ]	61
Power output [W]	25
Dimmable	No
Radiation angle [°]	80
Dimensions (length x width x height) [mm]	245 x 135 x 38

Abbildung 49: Spektrum und Eigenschaften der eingesetzten LED-Leuchten ([www.b2b.bioledex.de/bioledex-astir-led-pflanzenleuchte.html](http://www.b2b.bioledex.de/bioledex-astir-led-pflanzenleuchte.html), 2019)

Die Beleuchtung wurde zunächst mit Hilfe einer Software simuliert, welche vom Hersteller bereitgestellt wurde (<https://www.goleaf.de/en/online-calculator>, 2019), um eine möglichst gleichmäßige Lichtverteilung von  $150\text{--}200 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  über allen Kulturen zu erreichen. Als Konsequenz wurden vier der o.g. LED's in einem mittleren Abstand von 65 cm über den Kulturen platziert (siehe Abbildung 50).



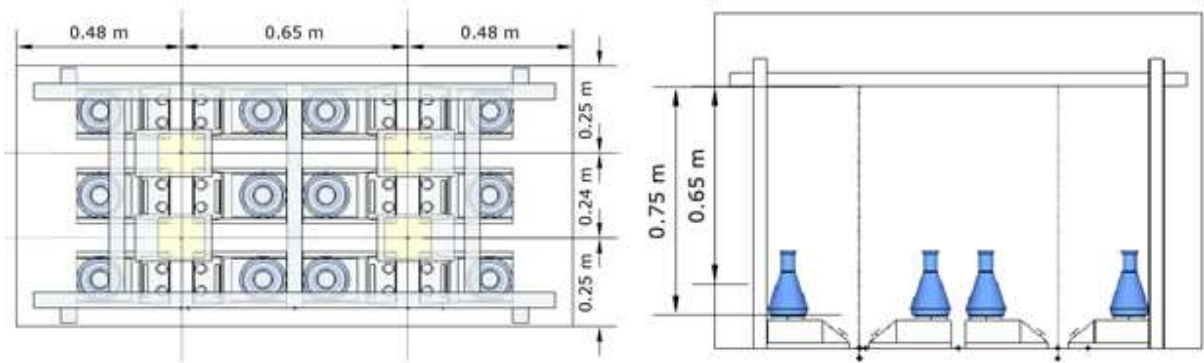


Abbildung 50: Versuchsaufbau der Laborkulturen

Die Lichtintensitätsverteilung wurde nochmals mit Hilfe eines Quantummeters (Apogee MQ-210 Quantum meter and Apogee 500-series) überprüft, indem der Sensor auf mittlerer Höhe der Erlenmeyerkolben (ca. 20 cm über dem Abzugsboden) platziert wurde. Die auf diese Weise gemessene Lichtintensität ist in Abbildung 51 dargestellt.

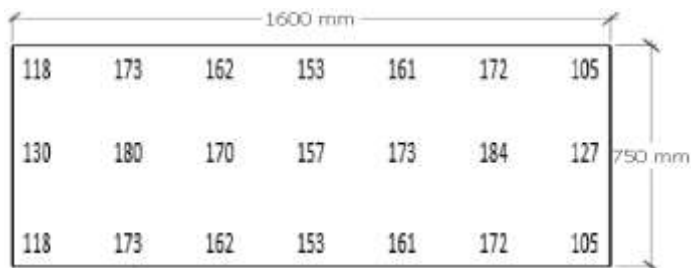


Abbildung 51: Lichtverteilung im Laborabzug als Aufsicht über der Abzugsfläche

Der endgültige Versuchsaufbau im Abzug ist in Abbildung 52 gezeigt:



Abbildung 52: Endgültiger Versuchsaufbau der Laborkulturen

Kontrollkulturen ohne Algeninokulation wurden verwendet, um den Einfluss der Algenaktivität zu quantifizieren. Alle Versuchsansätze einer Kontrollgruppe wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Wachstumsraten wurden entsprechend dem Abschnitt „Bestimmung der Mikroalgenkonzentrationen und der Wachstumsraten“ ab Seite 78 gemessen.

#### Verwendung von Sickerwässern der Deponie Leppe (Reservoir 1 und DA 4/5)

Während des ersten Experimentes wurden Sickerwässer vom „Reservoir 1“ und Abschnitt „DA4/5“ der Deponie Leppe verwendet. Weitere Informationen zu den Entnahmepunkten und der Charakterisierung der Sickerwässer sind in Abschnitt „Kulturmedien“ ab Seite 74 aufgeführt. Die Kulturen im Versuchsaufbau wurden entsprechend Abbildung 53 randomisiert.

D3	C3	A2	C2
A1	D2	C1	B2
B1	A3	B3	D1

Abbildung 53: Draufsicht auf den randomisierten Versuchsaufbaus von Experiment 1. A: „Reservoir 1“ inokuliert; B: „DA 4/5“ inokuliert; C: Kontrollkultur „Reservoir 1“ (ohne Inokulation); D: Kontrollkultur „DA 4/5“ (ohne Inokulation)

#### Verwendung von Sickerwässern der Deponien Aßlar und Reiskirchen

Im zweiten Experiment wurden zwei weitere Sickerwässer von fremden Deponien als Medium eingesetzt (Deponien Aßlar und Reiskirchen). Weitere Informationen zu den Entnahmepunkten und der Charakterisierung der Sickerwässer sind in Abschnitt „Kulturmedien“ auf Seite 74 aufgeführt. Die Kulturen im Versuchsaufbau wurden entsprechend Abbildung 54 randomisiert.

A2	D1	D2	A1
A3	C1	C3	B2
B1	B3	D3	C2

Abbildung 54: Draufsicht auf den randomisierten Versuchsaufbaus von Experiment 2. A: „Aßlar“ inokuliert; B: „Reiskirchen“ inokuliert; C: Kontrollkultur „Aßlar“ (ohne Inokulation); D: Kontrollkultur „Reiskirchen“ (ohne Inokulation)

Die unterschiedlichen Belastungen und andere Wasserparameter der verwendeten Sickerwässer sind in Tabelle 16 auf der Seite 75 im Anhang dargestellt.

#### Reproduzierbarkeit der Wachstumsraten

Um die Wiederholbarkeit der im Arbeitspaket 1.5 demonstrierten Wachstumsraten zu überprüfen (siehe auch Tabelle 4), wurden zwei weitere Experimente unter identischen Kultivierungsbedingungen durchgeführt. Als Kultivierungsmedien wurden in beiden Reproduktionsversuchen Sickerwässer der Deponie Leppe verwendet. Im Ersten vom Entnahmeschacht „DA 4/5“ und im Zweiten vom „Reservoir 1“. Alle hier vorgestellten Versuche wurden im Triplikate durchgeführt. Die Wachstumsraten wurden ermittelt indem die gemessenen Extinktionswerte mit Hilfe einer zuvor durchgeführten Korrelation (Anhang ab Seite 80) in die Biomassekonzentration umgerechnet wurden. Die Wachstumsraten wurden als Differenz der Biomassekonzentrationen vom jeweiligen Tag zum Folgetag ermittelt.

### **AP 2.1 (Universität Gießen)**

Die Versuche des vorliegenden Arbeitspaketes wurden in einer Klimakammer bei konstanten Temperaturen und festen Beleuchtungsintervallen durchgeführt. Als Vorlage des Versuchsaufbaus diente der Aufbau, der bereits in Arbeitspaket 1.1 angewandt wurde (siehe oben) gezeigt wurde. Als Beleuchtung diente eine Leuchtstoffröhre (Hi Lite, 36 W, 4000 Kelvin) mit einer Beleuchtungsstärke von 1970 Lux. Die Beleuchtungszeit betrug 14 Stunden mit einer anschließenden Dunkelzeit von 10 Stunden. Die Versuchsgefäße wurden kontinuierlich über Druckluft belüftet. Unter den gegebenen Temperatur und Druckbedingungen, wurde die maximale Löslichkeit von CO<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> erreicht. Verdunstetes Probematrix wurde täglich mit destilliertem Wasser kompensiert. Die Verdunstungsmenge wurde über den Wasserstand ermittelt. Wechselnde Parameter waren für die Versuchsreihe „Temperatur“ drei unterschiedliche, aber über den Versuchszeitraum konstante Temperaturen von 18°C, 25°C und 30°C, die in der Praxis im Sickerwasser erreicht werden. In der Versuchsreihe „Licht“ wurden die Versuche bei denselben Temperaturen wiederholt, jedoch wurde eine zweite Leuchtstoffröhre (Hi Lite, 36 W, 4000 Kelvin) als zusätzliche Beleuchtung verwendet, wodurch die Algen mit einer gesamten Beleuchtungsstärke von 2690 Lux bestrahlt wurden. Die Luxstärke wurde mit einem handelsüblichen Lux-meter gemessen. In der Versuchsreihe „pH-Wert“ betrug die Temperatur 30 °C bei doppelter Beleuchtungsintensität. Der pH-Wert wurde bei Bedarf mit Natronlauge oder Salzsäure auf einen pH-Wert von 6,5, 7 und 8 eingestellt.

Die Sickerwasserproben wurden nach Entnahme aus der Deponie bei Raumtemperatur gelagert. Zum Versuchsstart wurden die Proben durch Schütteln homogenisiert und anschließend über einen Filter (Whatman GF10), mit einer Porenweite von 10 µm, filtriert, bevor sie in die Gaswaschflaschen gefüllt wurden. Das standortangepasste Mikroalgen-Bakterien-Konsortium der Deponie Leppe wurde hinzugegeben und die Startbiomasse auf einen Extinktionswert von 0,3 bei 680nm, bzw. einer Biomassekonzentration von 05 g/L, eingestellt. Die Versuchsansätze fanden als Triplikat statt und wurden randomisiert platziert.

Alle Versuchsansätze wurden täglich beprobt und die Extinktion, die Temperatur und der pH-Wert gemessen.

### **AP 2.2 (TH-Köln)**

Die hier durchgeführten Analysen basieren auf den beiden Versuchen, wie sie für Arbeitspaket 1.5 ab Seite 17 dargestellt wurden. Die Konzentrationen abwasserrelevanter Inhaltsstoffe wurden mit Hilfe von Küvetten-Tests gemessen (siehe Abschnitt „Bestimmung der Konzentrationen abwasserrelevanter Inhaltsstoffe“ ab Seite 82). Die bei den Versuchen verwendeten Materialien sowie die analytischen Methoden sind im Abschnitt Material und Methoden ab Seite 73 erläutert.

### **AP 2.3 (TH-Köln)**

Die bei den Versuchen verwendeten Materialien sowie analytische Methoden sind im Abschnitt Material und Methoden ab Seite 73 dargestellt.

Im Arbeitspaket 2.3 wurden insgesamt vier Versuche durchgeführt, in denen das Mikroalgen-Bakterien-Konsortium in einem größeren Maßstab kultiviert wurde. In den ersten beiden Versuchen

wurden Suspensionskulturen im IBC-Maßstab eingesetzt. In den Versuchen drei und vier wurden biofilm-basierte Kulturen auf auftreibenden Trägermembranen verwendet. Der Versuch 3 sollte als Vorversuch für Versuch vier dienen. Hier wurden ein 17 L Becken verwendet. Im vierten Versuch wurde dieses Konzept letztlich in den 120 L – IBC - Maßstab hochskaliert, um eine bessere Vergleichbarkeit mit den Versuchen eins und zwei zu ermöglichen.

In allen IBC-Kulturen wurde das Medium mit Hilfe einer Aquariumpumpe durchmischt und mit einem CO<sub>2</sub>-/Luft-Gemisch mit einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5-10 % über einen Sprudelstein permanent begast. Der pH-Wert sollte auf diese Weise bei unter 7 gehalten werden. In Versuch 3 wurde nicht durchmischt oder begast. Als Medium wurde immer Deponiesickerwasser der Deponie Leppe aus Reservoir 1 verwendet. Die Beleuchtung erfolgte 14 Stunden pro Tag über LED-Lampen (Bioledex LFL-25RB-373) in den IBC's oder über Leuchtstoffröhren (4 x Osram Lumilux L58/840 cool white, CRI > 80 Ra) im Vorversuch zur membran-basierten Kultivierung.

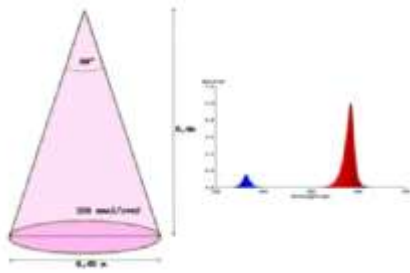
Die Suspensionskulturen wurden mit dem am Standort Leppe isolierten Mikroalgen-Bakterien-Konsortium, mit einer Anfangskonzentration von etwa 0,5 g/L (OD bei 680 nm von ca. 0,25) beimpft. Das Wachstum der Mikroalgen wurde, wie auch schon bei den Laborkulturen, über die optische Dichte bei 680 nm bestimmt (siehe Abschnitt „Bestimmung der Mikroalgenkonzentrationen und der Wachstumsraten“ ab Seite 78). Bei den membran-basierten Kulturen wurde mit etwa 2 g/m<sup>2</sup> Inokulum beimpft. Das Wachstum wurde über die Differenz von Anfangs und Endgewicht der getrockneten Membranen bestimmt. Wie in Abschnitt „Bestimmung der Konzentrationen abwasserrelevanter Inhaltsstoffe“ auf Seite 82 beschrieben, wurden die Konzentrationsveränderungen von Ammonium-N, Nitrit-N, Nitrat-N, Phosphat-P und vom CSB-Wert im Versuchsverlauf von Versuch zwei und vier untersucht. Gleichzeitig wurden in regelmäßigen Abständen relevante Wasserparameter wie pH-Wert, Temperatur und Konduktivität überwacht.

### IBC Suspensionskultur im Batch

Das erste Experiment diente dazu, abzuschätzen, bis zu welchem Wasserstand die Algen in den IBC's Wachstum zeigen. Um diese Abhängigkeit vom Wasserstand der stark mit Trübstoffen belasteten Sickerwässer zu überprüfen, sollten verschiedene Wasserstände in Skalierungsschritten von 10 cm = 120 L, 15 cm = 180 L und 20 cm = 240 L eingestellt werden. Die Beleuchtung wurde mit Hilfe der Software des Herstellers vorab simuliert (<https://www.goleaf.de/en/online-calculator>, 2019). Die auf diese Weise simulierten Beleuchtungsflächen und Intensitäten bei den unterschiedlichen Wasserständen sind in Abbildung 55 dargestellt.

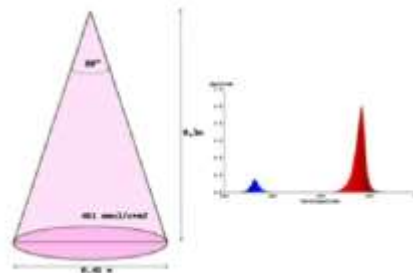
### 10 cm Wassertiefe

Lamp: Bioledex GoLeaf LFL-25RB-373, 25W, S3  
 Light diameter at the plant: 0.49 m  
 Area of the light cone on the plant: 0.19 m<sup>2</sup>  
 Photon flux density, PPFD on the plant: 320  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$



### 15 cm Wassertiefe

Lamp: Bioledex GoLeaf LFL-25RB-373, 25W, S3  
 Light diameter at the plant: 0.41 m  
 Area of the light cone on the plant: 0.13 m<sup>2</sup>  
 Photon flux density, PPFD on the plant: 461  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$



### 20 cm Wassertiefe

Lamp: Bioledex GoLeaf LFL-25RB-373, 25W, S3  
 Light diameter at the plant: 0.27 m  
 Area of the light cone on the plant: 0.06 m<sup>2</sup>  
 Photon flux density, PPFD on the plant: 1,037  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$

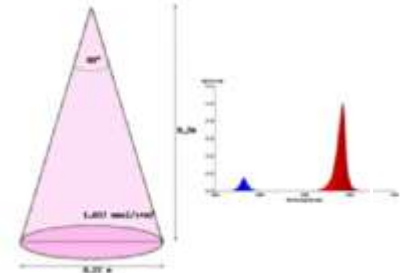


Abbildung 55: Lichtintensitäten und Beleuchtungsflächen bei unterschiedlichen Wasserständen des Kultivierungsmediums im IBC-Versuch

Der grundlegende Versuchsaufbau ist in Abbildung 56 dargestellt. Zwei der IBC's (Inokulierte Kultur 1 und 2) wurden mit dem standortangepassten Mikroalgen-Bakterien-Konsortium beimpft (Start-Inokulum: ca. 0,5 g/L). Ein IBC wurde zusätzlich zur quantitativen Abschätzung des Algeneinflusses auf den Abbau abwasserrelevanter Inhaltsstoffe als Kontrollkultur verwendet. Hier wurde nicht mit dem standortangepassten Mikrolagen-Konsortium beimpft, sondern nur Roh-Sickerwasser eingefüllt. Alle IBC's wurden mit einem Plexiglasdeckel verschlossen, um die Verdunstungsrate möglichst gering zu halten.



Abbildung 56: A) Begasung, Pumpe und Beleuchtung im IBC-Versuch; B) Grundlegender Versuchsaufbau der IBC-Suspensionskulturen (Versuch 3)

### IBC Suspensionskultur im Fed-Batch-Raceway

Im zweiten Experiment wurde ein s.g. „Fed – batch – Raceway – Ansatz“ verwendet. Dazu wurden Trennwände in den IBC eingezogen, um die während des Batch-Versuches beobachtete Ablagerung der Algenbiomasse am Boden der Behälter zu verringern. Außerdem wurde eine zweite Pumpe installiert, welche zu einer Kreisströmung führte („Raceway“). Der Deckel wurde in diesem Ansatz weggelassen. An den Tagen 9 und 12 wurden jeweils 60 L Sickerwasser als „Fed-Batch-Ansatz“

nachgefüllt. Die Lichtintensität wurde durch Hinzufügen einer weiteren Lampe verdoppelt. Aufgrund der Komplexität des Aufbaus und der hohen Algenmenge, die zur Inokulation verwendet werden musste, wurde nur ein IBC verwendet (siehe Abbildung 57).



Abbildung 57: Versuchsaufbau im Fed-Batch-Raceway-Versuch

#### Biofilmbasierte Kultivierung (Vorversuch im 17 L Maßstab)

Im letzten Versuch wurde mit demselben Sickerwasser eine membranbasierte Kultivierung getestet. Dazu wurden drei Becken verwendet und aufschwimmende Filtermatten als Kultivierungsfläche mit Hilfe von Aufschwimmkörpern an der Oberfläche gehalten (siehe Abbildung 39).



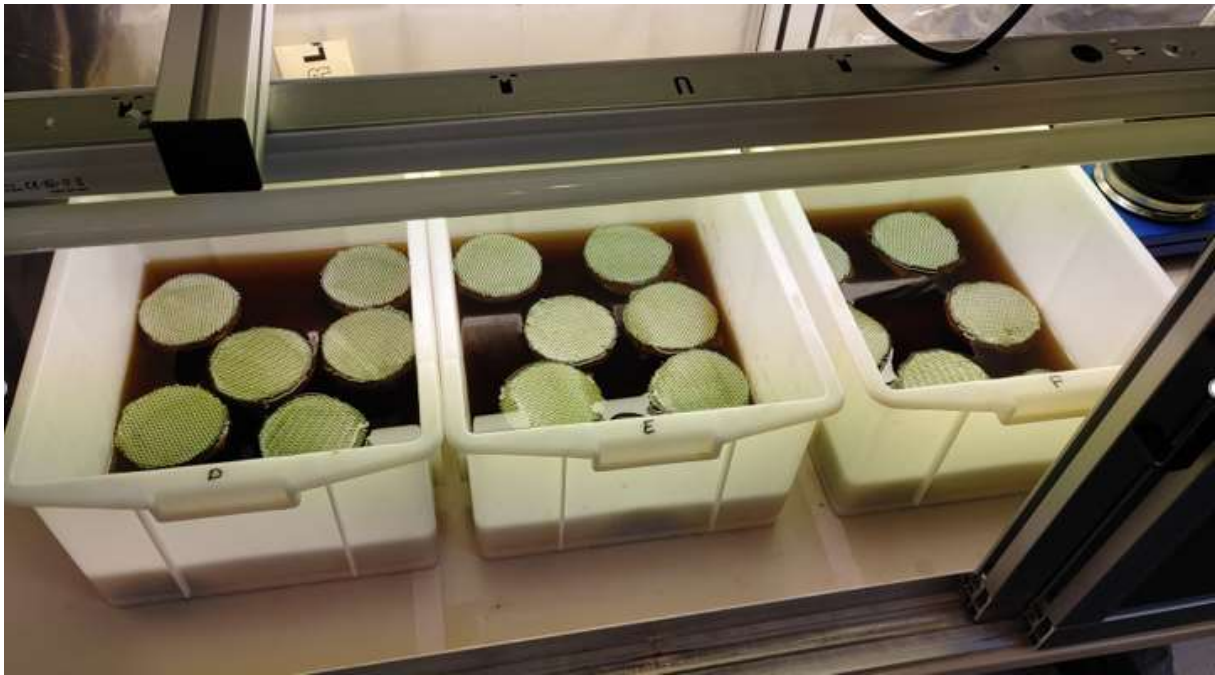


Abbildung 58: Schwimmende Membrankultur mit Algeninokulum an Tag 1 der Kultivierung

In diese Kästen wurden etwa 17 Liter Sickerwasser der Deponie Leppe (Reservoir 1) gefüllt. Der Wasserstand lag bei ca. 15 cm. In jedem der Kästen wurden sieben Membranen mit einer Algenmenge von etwa  $2 \text{ g/m}^2$  beimpft. Die Membranen hatten einen Durchmesser von ungefähr 10 cm. Zur Beleuchtung kamen hier Osram-Leuchtstoffröhren (Lumilux L58/840 cool white, CRI > 80 Ra) zum Einsatz. Die Lichtintensität an den Kulturen betrug etwa  $80 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ . Der pH-Wert wurde nicht reguliert. Es wurden täglich Proben zur Bestimmung der Ammoniumkonzentrationen genommen. Die Algenbiomasse wurde nach 9-tägiger Kultivierung geerntet, getrocknet und zur Bestimmung der Wachstumsraten gewogen. Nach dem Versuch wurden die Membranen aus dem Medium entnommen, im Trockenschrank für ca. 24 h bei  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  getrocknet und die Differenz zum Gewicht vor der Kultivierung bestimmt. Die Inokulationsmenge wurde bei der Ermittlung der geernteten Biomasse berücksichtigt.

#### Biofilm-Basierte Kultivierung (Versuch im IBC - Maßstab)

Auf Grundlage des Vorversuches (siehe oben) wurde die Biofilm-basierte Kultivierung in den IBC-Maßstab übertragen. In Abweichung zum Vorversuch wurden die Membranoberflächen auf einen Durchmesser von 15 cm vergrößert. Mit Hilfe eines Gummischlauchs konnten Sie etwa 1 bis 2 mm unterhalb der Wasseroberfläche gehalten werden, wodurch das Wachstum optimiert werden sollte. Auf der Wasseroberfläche der IBC's wurden auf diese Weise 7 derartige Membranen platziert und mit Hilfe eines Wasserschlauchs und Gewichten, innerhalb der  $0,5 \text{ m}^2$ -Fläche der konstanten Beleuchtungsintensität von  $\sim 320 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ .



Abbildung 59: Membrankulturen im Versuch „Biofilm-Basierte Kultivierung (Versuch im IBC-Maßstab)“; links: Membran mit Schlauch-Auftriebskörper; rechts: Anordnung der Membranen auf der Wasseroberfläche im IBC

Der generelle Versuchsaufbau ist in Abbildung 60 dargestellt. Es wurden zwei Kontrollkulturen, ohne Inokulation mit dem Mikroalgen-Bakterien-Konsortium, verwendet (B + C). Die erste Kontrollkultur (B) wurde identisch zur inokulierten Kultur beleuchtet. Die zweite Kontrollkultur (C) wurde abgedunkelt, um die Veränderungen der Biomasse auf den Membranen sowie die Reduktion abwasserrelevanter Inhaltsstoffe ohne Licht und phototrophes Wachstum ermitteln zu können.

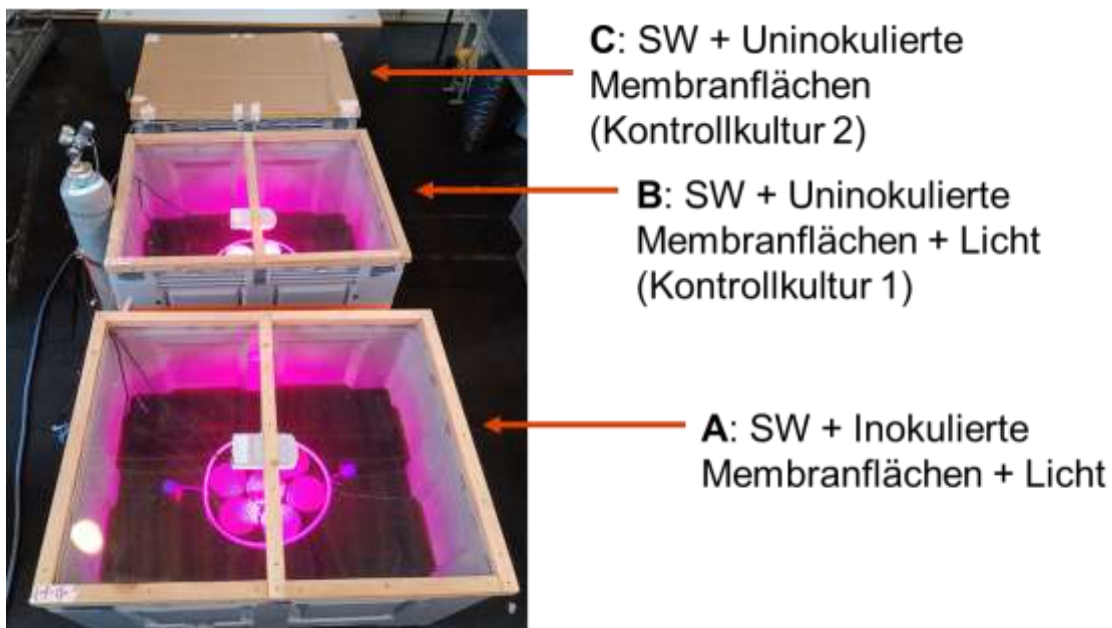


Abbildung 60: Genereller Versuchsaufbau „Biofilm-Basierte Kultivierung (Versuch im IBC-Maßstab)“

Der Aufbau hinsichtlich Begasung, Durchmischung, Wasserstand und Beleuchtungsintensität, war identisch zu den Bedingungen in den Suspensionskulturen (siehe oben): Mischbegasung (ca. 5 - 10 % CO<sub>2</sub> und 90 – 95 % Umgebungsluft); Durchmischung mit Aquariumpumpen; Wasserstand von 10 cm (120 L); Beleuchtungsintensität von ~ 320 μmol/(m<sup>2</sup>\*s)). Die Durchmischung durch die Aquariumpumpen wurde jedoch auf ungefähr die Hälfte reduziert, um zu verhindern, dass die Membranen durch eine zu starke Strömung unter Wasser gedrückt werden. Zusätzlich wurde ein Heizstab integriert, um die Temperatur in den Wintermonaten auf ein ähnliches Niveau zu bringen wie in den vorherigen



Versuchen (~ 24 – 25 °C). Nach der 15-tägigen Kultivierungszeit, wurden die Membranen aus dem Medium entnommen, im Trockenschrank für ca. 16 h bei 45 °C getrocknet und die Differenz zum Gewicht vor der Kultivierung bestimmt. Die Inokulationsmenge wurde bei der Ermittlung der geernteten Biomasse berücksichtigt.

## Quellenverzeichnis

Abeliovich, A. and Azov, Y. (1976) 'Toxicity of ammonia to algae in sewage oxidation ponds', *Applied and Environmental Microbiology*, 31(6), pp. 801–806. doi: 10.1128/aem.31.6.801-806.1976.

AbwV (2016) *Verordnung über Anforderungen an das Einleiten von Abwasser in Gewässer*.

Andersen, R. A. (2013) 'The Microalgal Cell', in *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*. John Wiley and Sons, pp. 1–20. doi: 10.1002/9781118567166.ch1.

Annesley, T. M. (2010) 'Who, what, when, where, how, and why: The ingredients in the recipe for a successful methods section', *Clinical Chemistry*, pp. 897–901. doi: 10.1373/clinchem.2010.146589.

Atkinson, A. W., Gunning, B. E. S. and John, P. C. L. (1972) 'Sporopollenin in the cell wall of *Chlorella* and other algae: Ultrastructure, chemistry, and incorporation of <sup>14</sup>C-acetate, studied in synchronous cultures', *Planta*. Springer-Verlag, 107(1), pp. 1–32. doi: 10.1007/BF00398011.

Beijerinck, M. W. (1890) 'Kulturversuche mit Zoochloren, Lichenengonidien und anderen niederen Algen.', *Botanische Zeitschrift* 48, pp. 725–785.

Bellingier, E. G. and Sigeo, D. C. (2010) *Freshwater Algae, Freshwater Algae: Identification and Use as Bioindicators*. doi: 10.1002/9780470689554.

Bharagava, R. N. and Chowdhary, P. (2018) *Emerging and eco-friendly approaches for waste management, Emerging and Eco-Friendly Approaches for Waste Management*. doi: 10.1007/978-981-10-8669-4.

Blanken, W. *et al.* (2016) 'Predicting microalgae growth', *Algal Research*. Elsevier, 14, pp. 28–38. doi: 10.1016/j.algal.2015.12.020.

Bock, C., Krienitz, L. and Pröschold, T. (2011) 'Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (Trebouxiophyceae) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species', *Fottea*, 11(2), pp. 293–312. doi: 10.5507/fot.2011.028.

Boles, B. R., Thoendel, M. and Singh, P. K. (2004) 'Self-generated diversity produces "insurance effects" in biofilm communities', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 101(47), pp. 16630–16635. doi: 10.1073/pnas.0407460101.

Büscher, B. *et al.* (2017) 'Weiterentwicklung eines Verfahrens zur Behandlung von Sickerwasser mit Hilfe eines identifizierten Algentypus unter Verwendung von CO<sub>2</sub> aus dem Rotteprozess einer MBA-Deponie mit Energiebilanz', p. 91. Available at: <https://www.dbu.de/OPAC/ab/DBU-Abschlussbericht-AZ-32197.pdf>.

Büscher, B., Harborth, P. and Thiel, T. (2013) *Entwicklung eines integrierten Verfahrens zum Einsatz von Algen zur Steigerung der Energiebereitstellung und – effizienz und zur Verringerung der CO<sub>2</sub> - Emissionen von Vergärungsanlagen Abschlussbericht*.

Cai, T., Park, S. Y. and Li, Y. (2013) 'Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, pp. 360–369. doi: 10.1016/j.rser.2012.11.030.

- Chang, H. *et al.* (2019) 'Microalgal lipids production and nutrients recovery from landfill leachate using membrane photobioreactor', *Bioresource Technology*. Elsevier, 277(November 2018), pp. 18–26. doi: 10.1016/j.biortech.2019.01.027.
- Cheah, W. Y. *et al.* (2016) 'Cultivation in wastewaters for energy: A microalgae platform', *Applied Energy*. Elsevier Ltd, pp. 609–625. doi: 10.1016/j.apenergy.2016.07.015.
- Chen, W., Tong, H. and Liu, H. (2012) 'Effects of nitrate on nitrite toxicity to *Microcystis aeruginosa*', *Marine Pollution Bulletin*. Pergamon, 64(6), pp. 1106–1111. doi: 10.1016/j.marpolbul.2012.04.006.
- Cheng, H. X. and Tian, G. M. (2013) 'Preliminary evaluation of a newly isolated microalga *Scenedesmus* sp. CHX1 for treating landfill leachate', in *Proceedings of the 2013 3rd International Conference on Intelligent System Design and Engineering Applications, ISDEA 2013*, pp. 1057–1060. doi: 10.1109/ISDEA.2012.249.
- Cho, D. H. *et al.* (2017) 'Microalgal diversity fosters stable biomass productivity in open ponds treating wastewater', *Scientific Reports*. Springer US, 7(1), pp. 1–11. doi: 10.1038/s41598-017-02139-8.
- Claude E. Boyd, C. S. T. (1998) *Pond Aquaculture Water Quality Management*. 1st edn, Springer Science & Business Media. 1st edn.
- Cybulski, B. *et al.* (2017) *Handbuch zur Betriebsanalytik auf Kläranlagen*.
- Darienko, T. *et al.* (2010) 'Chloroidium, a common terrestrial coccoid green alga previously assigned to *Chlorella* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta)', *European Journal of Phycology*, 45(1), pp. 79–95. doi: 10.1080/09670260903362820.
- Davis, R., Aden, A. and Pienkos, P. T. (2011) 'Techno-economic analysis of autotrophic microalgae for fuel production', *Applied Energy*. Elsevier Ltd, 88(10), pp. 3524–3531. doi: 10.1016/j.apenergy.2011.04.018.
- Edmundson (2012) 'ALGAE CULTIVATION ON LANDFILL LEACHATE: EXPLORING A NOVEL NUTRIENT SUPPLY FOR SUSTAINABLE BIO-RESOURCE PRODUCTION', 5(28 (3)), pp. 13–15.
- Edmundson, S. J. and Wilkie, A. C. (2013) 'Landfill leachate-a water and nutrient resource for algae-based biofuels', *Environmental Technology*, 34, pp. 1849–1857. doi: 10.1080/09593330.2013.826256.
- Feng, F. *et al.* (2020) 'Prediction of maximum algal productivity in membrane bioreactors with a light-dependent growth model', *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V., 753, p. 141922. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.141922.
- FOTT and B. (1969) 'A monograph of the genus *Chlorella*. The fresh water species', *Studies in Phycology*. Academia, pp. 10–70.
- Gao, F. *et al.* (2015) 'A novel algal biofilm membrane photobioreactor for attached microalgae growth and nutrients removal from secondary effluent', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 179, pp. 8–12. doi: 10.1016/j.biortech.2014.11.108.
- García-Meza, J. V., Barrangue, C. and Admiraal, W. (2005) 'Biofilm formation by algae as a mechanism for surviving on mine tailings', *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(3), pp. 573–581. doi: 10.1897/04-064R.1.
- Gera, G. S. *et al.* (2016) 'Kinetic Studies on an Algal Biofilm Reactor for Raw Sewage Water Treatment',

*Chemical Engineering and Technology*, 39(9), pp. 1629–1635. doi: 10.1002/ceat.201500447.

González-Fernández, C. *et al.* (2011) 'Impact of microalgae characteristics on their conversion to biofuel. Part II: Focus on biomethane production', *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*.

Görs, M. *et al.* (2010) 'THE POTENTIAL OF ERGOSTEROL AS CHEMOTAXONOMIC MARKER TO DIFFERENTIATE BETWEEN "CHLORELLA" SPECIES (CHLOROPHYTA)1', *Journal of Phycology*. John Wiley & Sons, Ltd, 46(6), pp. 1296–1300. doi: 10.1111/j.1529-8817.2010.00920.x.

Griffiths, M. J. *et al.* (2011) 'Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density', *Journal of Microbiological Methods*, 85(2), pp. 119–123. doi: 10.1016/j.mimet.2011.02.005.

Gross, M., Jarboe, D. and Wen, Z. (2015) 'Biofilm-based algal cultivation systems', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(14), pp. 5781–5789. doi: 10.1007/s00253-015-6736-5.

Guillard, R. R. L. and Sieracki, M. S. (2005) 'Counting Cells in Cultures with the Light Microscope', in *Algal Culturing Techniques*. Elsevier, pp. 239–252. doi: 10.1016/b978-012088426-1/50017-2.

Gutierrez, J. *et al.* (2016) 'Ammonia inhibition in oleaginous microalgae', *Algal Research*. Elsevier, 19, pp. 123–127. doi: 10.1016/j.algal.2016.07.016.

Hach-Lange, G. (2019) *No Title*. Available at: <https://de.hach.com/>.

Hamilton, D. P. and Schladow, S. G. (1997) 'Prediction of water quality in lakes and reservoirs. Part I - Model description', *Ecological Modelling*. Elsevier, 96(1–3), pp. 91–110. doi: 10.1016/S0304-3800(96)00062-2.

He, S. and Xue, G. (2010) 'Algal-based immobilization process to treat the effluent from a secondary wastewater treatment plant (WWTP)', *Journal of Hazardous Materials*. Elsevier, 178(1–3), pp. 895–899. doi: 10.1016/j.jhazmat.2010.02.022.

Hernández-García, A. *et al.* (2019) 'Wastewater-leachate treatment by microalgae: Biomass, carbohydrate and lipid production', *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Elsevier Inc., 174(February), pp. 435–444. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.02.052.

Heyer, K.-U. and Stegmann, R. (2005) 'Landfill Systems, Sanitary Landfilling of Solid Wastes, and Long-Term Problems with Leachate', in *Environmental Biotechnology*. Weinheim, FRG: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 375–394. doi: 10.1002/3527604286.ch15.

Hoornweg, D., Bhada-Tata, P. and Kennedy, C. (2013) 'Waste production must peak this century', *Nature*, 502(7473), pp. 615–617. doi: 10.1038/502615a.

<https://www.goleaf.de/en/online-calculator> (2019) *Online calculator*. Available at: [https://www.goleaf.de/online-rechner?gclid=CjwKCAiAi4fwBRBxEiwAEO8\\_Hgtsj-l1myZsuoqc5OnClp\\_q6SYVn6cwOa7QO2ow-oaDEig59cKaRoCfoMQAvD\\_BwE](https://www.goleaf.de/online-rechner?gclid=CjwKCAiAi4fwBRBxEiwAEO8_Hgtsj-l1myZsuoqc5OnClp_q6SYVn6cwOa7QO2ow-oaDEig59cKaRoCfoMQAvD_BwE).

Ikeda, T. and Takeda, H. (1995) 'SPECIES-SPECIFIC DIFFERENCES OF PYRENOIDS IN CHLORELLA (CHLOROPHYTA)', *Journal of Phycology*, 31(5), pp. 813–818. doi: 10.1111/j.0022-3646.1995.00813.x.

Johnson, M. B. and Wen, Z. (2010) 'Development of an attached microalgal growth system for biofuel production', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(3), pp. 525–534. doi: 10.1007/s00253-009-

2133-2.

Kessler, E. and Huss, V. A. R. (1992) 'COMPARATIVE PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY AND TAXONOMIC ASSIGNMENT OF THE CHLORELLA (CHLOROPHYCEAE) STRAINS OF THE CULTURE COLLECTION OF THE UNIVERSITY OF TEXAS AT AUSTIN', *Journal of Phycology*, 28(4), pp. 550–553. doi: 10.1111/j.0022-3646.1992.00550.x.

Körner, S. *et al.* (2001) 'The effect of pH variation at the ammonium/ammonia equilibrium in wastewater and its toxicity to *Lemna gibba*', *Aquatic Botany*, 71(1), pp. 71–78. doi: 10.1016/S0304-3770(01)00158-9.

Kranert, M. and Cord-Landwehr, K. (2010) *Einführung in die Abfallwirtschaft*. 4th edn, *Proceedings of the Association for Information Science and Technology*. 4th edn. Vieweg, Teubner. doi: 10.1002/pr2.2017.14505401013.

Krienitz, L. *et al.* (2004) 'Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* gen. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae)', *Phycologia*. International Phycological Society, 43(5), pp. 529–542. doi: 10.2216/i0031-8884-43-5-529.1.

Landschaft, B. (2010) *Sebastian Wolfgarten Prognose des Sickerwasseraufkommens und der Sickerwasserqualität nach Abschluss der Abfallablagerung am Beispiel der Deponie Aßlar veröffentlicht in.*

LANUV (2002) *4 Emissionsverhalten von Deponien*.

Lee, E., Jalalizadeh, M. and Zhang, Q. (2015) 'Growth kinetic models for microalgae cultivation: A review', *Algal Research*. Elsevier, pp. 497–512. doi: 10.1016/j.algal.2015.10.004.

Lee, H. Y. *et al.* (2010) 'Simple and highly effective DNA extraction methods from old skeletal remains using silica columns', *Forensic Science International: Genetics*. Elsevier, 4(5), pp. 275–280. doi: 10.1016/j.fsigen.2009.10.014.

Liao, Q. *et al.* (2018) *Physiological-phased kinetic characteristics of microalgae *Chlorella vulgaris* growth and lipid synthesis considering synergistic effects of light, carbon and nutrients*, *Bioresource Technology*. doi: 10.1016/j.biortech.2017.11.086.

Limnosun, G. (2016) 'Nachhaltiges, innovatives und dezentrales Abwasserreinigungssystem inklusive der Mitbehandlung des Biomülls auf Basis alternativer Sanitärkonzepte"', pp. 1–56.

Lin, L. *et al.* (2007) 'Use of ammoniacal nitrogen tolerant microalgae in landfill leachate treatment', *Waste Management*, 27(10), pp. 1376–1382. doi: 10.1016/j.wasman.2006.09.001.

Liu, J. *et al.* (2017) 'Advanced nutrient removal from surface water by a consortium of attached microalgae and bacteria: A review', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 241, pp. 1127–1137. doi: 10.1016/j.biortech.2017.06.054.

Mallick, N. (2002) 'Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review', *BioMetals*, 15(4), pp. 377–390. doi: 10.1023/A:1020238520948.

Melkonian, M. and Podola, B. (2004) 'Method and device for cultivating eucaryotic microorganisms or blue algae, and biosensor with cultivated eucaryotic microorganisms or blue algae'. United States. Available at: <https://patents.google.com/patent/US7745201B2/en> (Accessed: 17 February 2020).

- Molina Grima, E. *et al.* (2003) 'Recovery of microalgal biomass and metabolites: Process options and economics', *Biotechnology Advances*, 20(7–8), pp. 491–515. doi: 10.1016/S0734-9750(02)00050-2.
- Mussnug, J. H. (2010) 'Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept', pp. 1–6. doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.07.030.
- Mustafa, E. M., Phang, S. M. and Chu, W. L. (2012) 'Use of an algal consortium of five algae in the treatment of landfill leachate using the high-rate algal pond system', *Journal of Applied Phycology*, 24(4), pp. 953–963. doi: 10.1007/s10811-011-9716-x.
- Naumann, T. *et al.* (2013) 'Growing microalgae as aquaculture feeds on twin-layers: A novel solid-state photobioreactor', *Journal of Applied Phycology*, 25(5), pp. 1413–1420. doi: 10.1007/s10811-012-9962-6.
- Nawaz, T. *et al.* (2020) 'A review of landfill leachate treatment by microalgae: Current status and future directions', *Processes*, 8(4), pp. 1–20. doi: 10.3390/PR8040384.
- Nordin, N., Yusof, N. and Samsudin, S. (2017) 'Biomass Production of *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., and *Oscillatoria* sp. in Nitrified Landfill Leachate', *Waste and Biomass Valorization*, 8(7), pp. 2301–2311. doi: 10.1007/s12649-016-9709-8.
- El Ouaer, M. *et al.* (2017) 'Tunisian landfill leachate treatment using *Chlorella* sp.: effective factors and microalgae strain performance', *Arabian Journal of Geosciences*, 10(20), pp. 22–25. doi: 10.1007/s12517-017-3241-4.
- Ozkan, A. *et al.* (2012) 'Reduction of water and energy requirement of algae cultivation using an algae biofilm photobioreactor', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 114, pp. 542–548. doi: 10.1016/j.biortech.2012.03.055.
- Paliwal, C. *et al.* (2016) 'Microalgal carotenoids: Potential nutraceutical compounds with chemotaxonomic importance', *Algal Research*. Elsevier B.V., 15, pp. 24–31. doi: 10.1016/j.algal.2016.01.017.
- Pancasakti Kusumaningrum, H. and Zainuri, M. (2014) 'Allelopathy Effect of the Blue Diatom *HasleaOstrearia* (Gaillon) Simonsen: Growth Inhibition in Aquaculture Relevant Microalgae', *International Journal of Marine and Aquatic Resource Conservation and Co-existence*, 1(1), pp. 19–26. doi: 10.14710/ijmarcc.1.1.p.
- Paskuliakova, A. *et al.* (2018) 'Phycoremediation of landfill leachate with the chlorophyte *Chlamydomonas* sp. SW15aRL and evaluation of toxicity pre and post treatment', *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Academic Press, 147, pp. 622–630. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.09.010.
- Paskuliakova, A., Tonry, S. and Touzet, N. (2016) 'Phycoremediation of landfill leachate with chlorophytes: Phosphate a limiting factor on ammonia nitrogen removal', *Water Research*. doi: 10.1016/j.watres.2016.04.029.
- Passos, F., García, J. and Ferrer, I. (2013) 'Impact of low temperature pretreatment on the anaerobic digestion of microalgal biomass', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 138, pp. 79–86. doi: 10.1016/j.biortech.2013.03.114.
- Patwardhan, A. W. (2003) 'Rotating biological contactors: A review', *Industrial and Engineering Chemistry Research*. American Chemical Society, pp. 2035–2051. doi: 10.1021/ie0200104.

- Pereira, S. F. L. *et al.* (2016) 'Nitrogen Removal from Landfill Leachate by Microalgae', *International Journal of Molecular Sciences Article*. doi: 10.3390/ijms17111926.
- Powell, N. *et al.* (2009) 'Towards a luxury uptake process via microalgae - Defining the polyphosphate dynamics', *Water Research*, 43(17), pp. 4207–4213. doi: 10.1016/j.watres.2009.06.011.
- Prajapati, S. K. *et al.* (2013) 'Phycoremediation and biogas potential of native algal isolates from soil and wastewater', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 135, pp. 232–238. doi: 10.1016/j.biortech.2012.08.069.
- Pröschold, T. *et al.* (2011) 'The systematics of *Zoochlorella* revisited employing an integrative approach.', *Environmental microbiology*, 13(2), pp. 350–64. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02333.x.
- Ramli, N. M., Monday, O. and Kazi, K. (2018) *Microalgae-bacteria interactions: a key for improving water quality in recirculating aquaculture systems?*
- Richards, R. G. and Mullins, B. J. (2013) 'Using microalgae for combined lipid production and heavy metal removal from leachate', *Ecological Modelling*. Elsevier B.V., 249, pp. 59–67. doi: 10.1016/j.ecolmodel.2012.07.004.
- Roeselers, G., Loosdrecht, M. C. M. Van and Muyzer, G. (2008) 'Phototrophic biofilms and their potential applications', *Journal of Applied Phycology*, 20(3), pp. 227–235. doi: 10.1007/s10811-007-9223-2.
- Roostaei, J. *et al.* (2018) 'Mixotrophic Microalgae Biofilm : A Novel Algae Cultivation Strategy for Improved Productivity and Cost- efficiency of Biofuel Feedstock Production', *Scientific Reports*. Springer US, (April), pp. 1–10. doi: 10.1038/s41598-018-31016-1.
- Sanders, B. G., Keller, E. C. and Wiley, K. L. (1971) 'IDENTIFICATION OF CHLORELLA STRAINS BY SEROLOGICAL TECHNIQUES', *Journal of Phycology*, 7(1), pp. 63–64. doi: 10.1111/j.1529-8817.1971.tb01480.x.
- Sanz-Luque, E. *et al.* (2015) 'Understanding nitrate assimilation and its regulation in microalgae', *Frontiers in Plant Science*. Frontiers Research Foundation. doi: 10.3389/fpls.2015.00899.
- Schultze, L. K. P. *et al.* (2015) 'High light and carbon dioxide optimize surface productivity in a twin-layer biofilm photobioreactor', *Algal Research*. Elsevier B.V., 8, pp. 37–44. doi: 10.1016/j.algal.2015.01.007.
- Sforza, E. *et al.* (2015) 'Exploitation of urban landfill leachate as nutrient source for microalgal biomass production', *Chemical Engineering Transactions*. Italian Association of Chemical Engineering - AIDIC, 43, pp. 373–378. doi: 10.3303/CET1543063.
- Shi, J., Podola, B. and Melkonian, M. (2007) 'Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae immobilized on twin layers: An experimental study', *Journal of Applied Phycology*. Springer, 19(5), pp. 417–423. doi: 10.1007/s10811-006-9148-1.
- Shi, J., Podola, B. and Melkonian, M. (2014) 'Application of a prototype-scale twin-layer photobioreactor for effective N and P removal from different process stages of municipal wastewater by immobilized microalgae', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 154, pp. 260–266. doi: 10.1016/j.biortech.2013.11.100.

- Shrift, A. and Sproul, M. (1963) 'Sulfur Nutrition and the Taxonomy of *Chlorella*', *Phycologia*. Informa UK Limited, 3(2), pp. 85–100. doi: 10.2216/i0031-8884-3-2-85.1.
- Sniffen, K. D., Sales, C. M. and Olson, M. S. (2016) 'Nitrogen removal from raw landfill leachate by an algae-bacteria consortium', *Water Science and Technology*, 73(3), pp. 479–485. doi: 10.2166/wst.2015.499.
- Spekat, A., Enke, W. and Kreienkamp, F. (2007) 'Deponienachsorge - Handlungsoptionen, Dauer, Kosten und quantitative Kriterien für die Entlassung aus der Nachsorge', (April), p. 149.
- Steiner, C. (2019) 'Entwicklung einer halbtechnischen Deponiesickerwasserreinigungsanlage und Analyse des Metaproteoms in Belebtschlamm', pp. 1–192.
- Sutherland, D. L. *et al.* (2015) 'The effects of CO<sub>2</sub> addition along a pH gradient on wastewater microalgal photo-physiology, biomass production and nutrient removal', *Water Research*. Elsevier Ltd, 70, pp. 9–26. doi: 10.1016/j.watres.2014.10.064.
- Tiedt (2015) *AbfallDeponieDaten-Informationssystem Benutzerhandbuch-Version 2.4 vom*. Available at: [www.lanuv.nrw.de](http://www.lanuv.nrw.de) (Accessed: 13 November 2020).
- Tighiri, H. O. and Erkurt, E. A. (2019) 'Biotreatment of landfill leachate by microalgae-bacteria consortium in sequencing batch mode and product utilization', *Bioresource Technology*. Elsevier, 286(April), p. 121396. doi: 10.1016/j.biortech.2019.121396.
- Tossavainen, M. *et al.* (2017) 'Culturing of *Selenastrum* on diluted composting fluids; conversion of waste to valuable algal biomass in presence of bacteria', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 238, pp. 205–213. doi: 10.1016/j.biortech.2017.04.013.
- Vandenbroucke, M. and Largeau, C. (2007) 'Kerogen origin, evolution and structure', *Organic Geochemistry*, pp. 719–833. doi: 10.1016/j.orggeochem.2007.01.001.
- VWR International, L. (2019) *Counting chambers, Imp. Neubauer, VWR*. Available at: <https://de.vwr.com/store/product/en/2991828/zahlkammer-neubauer-improved?languageChanged=en>.
- Warburg, O. (1919) 'Über die Geschwindigkeit der Kohlensäurezusammensetzung in lebenden Zellen.', *Biochemische Zeitschrift* 100, pp. 230–270.
- Wolf, G., Picioreanu, C. and Van Loosdrecht, M. C. M. (2007) 'Kinetic Modeling of Phototrophic Biofilms: The PHOBIA Model', *Biotechnol. Bioeng*, 97, pp. 1064–1079. doi: 10.1002/bit.21306.
- Wu, H.-L., Hseu, R.-S. and Lin, L.-P. (2001) — *Identification of Chlorella spp. isolates 115 Bot, Bull. Acad. Sin.*
- [www.b2b.bioledex.de/bioledex-astir-led-pflanzenleuchte.html](http://www.b2b.bioledex.de/bioledex-astir-led-pflanzenleuchte.html) (2019) *No Title*. Available at: <https://b2b.bioledex.de/bioledex-astir-led-pflanzenleuchte.html>.
- Xia, A. and Murphy, J. D. (2016) 'Microalgal Cultivation in Treating Liquid Digestate from Biogas Systems', *Trends in Biotechnology*. Elsevier Ltd, pp. 264–275. doi: 10.1016/j.tibtech.2015.12.010.
- Zhang, Z. and Cheng, Z. (2018) 'High-efficiency nutrients reclamation from landfill leachate by



- microalgae *Chlorella vulgaris* in membrane photobioreactor for bio-lipid production', *Bioresource Technology*. doi: 10.1016/j.biortech.2018.06.077.
- Zhao, X. *et al.* (2014a) 'Characterization of microalgae-bacteria consortium cultured in landfill leachate for carbon fixation and lipid production', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 156, pp. 322–328. doi: 10.1016/j.biortech.2013.12.112.
- Zhao, X. *et al.* (2014b) 'Characterization of microalgae-bacteria consortium cultured in landfill leachate for carbon fixation and lipid production', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 156, pp. 322–328. doi: 10.1016/j.biortech.2013.12.112.
- Zheng, H. *et al.* (2019) 'Cultivation of *Chlorella vulgaris* in manure-free piggery wastewater with high-strength ammonium for nutrients removal and biomass production: Effect of ammonium concentration, carbon/nitrogen ratio and pH', *Bioresource Technology*. Elsevier, 273(October 2018), pp. 203–211. doi: 10.1016/j.biortech.2018.11.019.
- Zhuang, L. L. *et al.* (2018a) 'The characteristics and influencing factors of the attached microalgae cultivation: A review', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 94(May), pp. 1110–1119. doi: 10.1016/j.rser.2018.06.006.
- Zhuang, L. L. *et al.* (2018b) 'The characteristics and influencing factors of the attached microalgae cultivation: A review', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Elsevier Ltd, pp. 1110–1119. doi: 10.1016/j.rser.2018.06.006.
- Zittelli, Graciella Chini; Rodolfi, Liliana; Bassi, Niccolo; Tredici, M. (2013) 'Photobioreactors for Microalgal Biofuel Production', *Algae for biofuels and energy*.
- Zorbach, M. (2014) 'Abschlussbericht', (April), pp. 1–193.

**Unterschriften Anhang sächlicher Teil zu Abschlußbericht ERA<sup>3</sup> Phase I vom 03.08.2021**

Projektleitende Person

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'A. Rehorek', enclosed within a large, loopy, circular flourish.

Prof. Dr. Astrid Rehorek

TH Köln

[astrid.rehorek@th-koeln.de](mailto:astrid.rehorek@th-koeln.de)

Tel. +49 176 107 207 46

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Stefan Gäth', written in a cursive style.

Prof. Dr. Stefan Gäth

JLU Gießen

[Stefan.A.Gaeth@umwelt.uni-giessen.de](mailto:Stefan.A.Gaeth@umwelt.uni-giessen.de)