

# **Abwasseraufbereitung mittels Mikroalgen - eine Prozessstrategie mit Zellrückführung für einen Tag/Nacht-Betrieb**

Zur Erlangung des akademischen Grades einer

**DOKTORIN DER INGENIEURWISSENSCHAFTEN**

von der KIT-Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik des  
Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)  
genehmigte

**Dissertation**

von

**M. Sc. Franziska Maria Ortiz Tena**  
(geb. Schwertner)  
aus Kelheim

Tag der mündlichen Prüfung: 22. März 2024

Erstgutachter: Prof. Dr.-Ing. Clemens Posten

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Harald Horn



*„Wenn ich wüsste, dass morgen die Welt unterginge,  
würde ich heute noch ein Apfelbäumchen pflanzen.“*

**angebliches Zitat Martin Luthers 1944**



# Zusammenfassung

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde eine Strategie für eine kontinuierliche Abwasseraufbereitung mittels Mikroalgen im 24-Stunden Betrieb entwickelt. Basis hierfür war zunächst die Etablierung eines geeigneten Abtrennsystems für die Mikroalgenzellen mit dem Ziel der kultivierungsbegleitenden Zellrückführung. Weiterhin stand der Stoffwechsel der Mikroalge *Chlorella vulgaris* (Biomassezusammensetzung und Nährstoffaufnahme) während kontinuierlicher Kultivierungen bei Licht und Dunkelheit im Fokus. In einem vereinfachten Modell konnten im Anschluss die Zusammenhänge verschiedener Limitierungszustände des Mikroalgenwachstums verbildlicht werden. Darauf aufbauend wurden die experimentellen Daten mittels des Modells und dem damit verbundenen Konzepts der aktiven Biomasse ausgewertet und die so gewonnenen Erkenntnisse für die Prozessoptimierung der Abwasseraufbereitung eingesetzt.

Als geeignete Methode zur Mikroalgenabtrennung wurde die Membranfiltration ausgewählt und zwei Abtrenneinheiten im Labor- und Pilotmaßstab (*Mini-Harvester* (~100 mL) und *Harvester* (~12 L)) erfolgreich entwickelt und umgesetzt. Das eingesetzte, kommerziell erhältliche Membranmodul des *Harvesters* ist aus in drei Bündeln angeordneten Membranhohlfasern aus Polyvinylidenfluorid (PVDF) mit einem nominalen Porendurchmesser von 0,03  $\mu\text{m}$  aufgebaut. Die Ausstattung der Anlage mit Sensorik (Messung von Durchflüssen, Drücken, Trübung) war für Forschungszwecke ausgelegt, eine Reduzierung des apparativen Aufwands kann je nach Anforderungen der Trennaufgabe geschehen. Für Versuche im Labormaßstab wurde der *Mini-Harvester* als Maßstabsverkleinerung des *Harvesters* mit analoger Geometrie konzipiert, wobei 12 einzelne Hohlfasern des Membranmoduls eingesetzt wurden. Der *Mini-Harvester* war an das am Institut vorhandene Photobioreaktor-Kultivierungssystem (zylindrischer, beleuchteter Glasreaktor, 2 L Arbeitsvolumen) koppelbar, wodurch ein Algen Membran-Photobioreaktor aufgebaut werden konnte.

Zunächst war die Charakterisierung der Membran mit Wasser sowie Mikroorganismensuspensionen (*Saccharomyces cerevisiae*, *Chlorella vulgaris*) an der Filtrationsanlage *Harvester* Gegenstand der experimentellen Arbeiten. Für die eingesetzte Membran konnte eine Funktion des zu erwartenden Reinstwasser-Filtrat-Flux in Abhängigkeit des angelegten Transmembrandrucks (TMP) ermittelt werden. Bei der Filtration zellhaltiger Suspensionen war ein linearer Zusammenhang zwischen kritischem Flux und Biomassekonzentration messbar, wobei vergleichsweise hohe Werte des kritischen Fluxes von 15,57 bzw. 10,08  $\text{L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  für dichte Mikroalgenkulturen (4,8 und 10,0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) erreicht wurden. Zudem konnte mit der eingesetzten Membran ein stabiler und kontinuierlicher Filtrationsbetrieb für mehr als eine Stunde bei einer Mikroalgenkonzentration von 40  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  im Retentat aufrechterhalten werden. Der *Harvester* zeichnete sich im Betrieb als energiearm und leistungsfähig aus: bei einer Aufkonzentrierung einer Mikroalgensuspension um Faktor 20 auf eine finale Konzentration von 40  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  wurden lediglich  $1,05\cdot 10^{-2}$  kWh pro kg geernteter Zellen benötigt. Damit ist die Filtrationsanlage prädestiniert für einen Einsatz im Abwasserbereich.

Zur Reduktion von Membran-Fouling wurden Frequenz und Dauer von periodischem Rückspülen (*Mini-Harvester*) und Pausieren (*Harvester*) sowie eine Belüftung der Membran (*Harvester*)

als Maßnahmen untersucht. Dabei wurde eine Belüftungsrate der Membranfasern von 1,25 vvm als Optimum identifiziert. Ein Rückspülen in einer Frequenz von 30 min für eine Dauer von 60 s wurde zudem für einen effizienten Filtrationsbetrieb festgestellt. Periodische Pausen waren für zwei Kombinationen aus Frequenz und Dauer (15 min/30 s sowie 30 min/60 s) gleichermaßen effektiv in der Fouling-Reduktion. Nichtsdestoweniger sind Frequenz und Dauer beider Maßnahmen (Rückspülen und Pausieren) an die jeweilige Aufgabenstellung anzupassen.

Eine Untersuchung des Fouling-Verhaltens der verschiedenen Komponenten einer Mikroalgen-suspension fand mit Hilfe des *Mini-Harvesters* statt und ergab die stärkste Fouling-Neigung bei Anwesenheit aller enthaltenen Bestandteile (Zellen, Zelldebris, gelöste Organik). Die enthaltenen Zellen schützten die Membran allerdings vor der Penetration gelöster Organik, wodurch das Fouling durch Rückspülen effizient entfernt werden konnte und somit als reversible klassifiziert wurde. Beim Einsatz realer Abwässer als Kulturmedium trug die enthaltene Organik ( $32,3 \text{ mg}_{\text{roc}} \cdot \text{L}^{-1}$ ) einen erheblichen Teil zum Fouling bei. Die durch die Mikroalgen gebildeten extrazellulären Polysaccharide zeigten im Vergleich dazu eine geringere Fouling-Neigung. Morphologische Unterschiede zwischen Mikroalgenpezies spielten lediglich eine untergeordnete Rolle bei der Fouling-Bildung. Nährstofflimitierungen in der stationären Wachstumsphase einer Mikroalgenkultur zeigten trotz hoher Biomassekonzentrationen eine verringerte Fouling-Neigung im Vergleich zu Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase.

Die kontinuierliche Kultivierung der Mikroalge *Chlorella vulgaris* bei einem Hell/Dunkel-Zyklus von 16 h:8 h bei verschiedenen Verdünnungsraten  $D$  ( $D = 0,0 \text{ d}^{-1}$ - $1,0 \text{ d}^{-1}$  in  $0,1 \text{ d}^{-1}$ -Schritten) zeigte einen Wechsel der Limitierungszustände des Mikroalgenwachstums von einer Nährstoff- hin zu einer Lichtlimitierung. Dabei fand ein an reale Abwässer angepasstes synthetisches Abwasser als Kulturmedium Einsatz, wobei das molare Verhältnis der Nährstoffe Stickstoff und Phosphor mit  $\sim 9:1$  unterhalb des physiologischen Optimums, ausgedrückt durch das sogenannte Redfield Verhältnis, von  $16:1$  lag. Mit zunehmender Verdünnungsrate  $D$  kam es zu einer Abnahme der Biomassekonzentration (von  $4,00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  auf  $1,35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) ab einem Schwellenwert von  $D = 0,3 \text{ d}^{-1}$ . Durch die Reduktion wurde der erhöhte Photonenbedarf der Zellen zur Aufrechterhaltung der aufgezwungenen Wachstumsrate gedeckt. Für alle getesteten Verdünnungsraten war eine vollständige Phosphoraufnahme aus dem synthetischen Abwasser nachweisbar, wodurch die Fähigkeit von *Chlorella vulgaris* zur Phosphatspeicherung (sog. *luxury uptake*) demonstriert wurde. Der Schwellenwert der vollständigen Stickstoffaufnahme lag bei  $D = 0,6 \text{ d}^{-1}$  und markiert damit das Limit des Systems für eine Anwendung zur Abwasserreinigung. Eine Variation der Zusammensetzung der Biotrockenmasse in Abhängigkeit der angewandten Durchflussrate war außerdem messbar. Unter Nährstofflimitierung (bis  $D = 0,4 \text{ d}^{-1}$ ) konnte die Bildung von kohlenstoffhaltigen Speicherstoffen (Stärke und Lipide) nachgewiesen werden. Eine engmaschige Beprobung der Nachtphase fand mit Fokus auf Nährstoffaufnahme und Zellzusammensetzung statt, wobei für eine spezifische Verdünnungsrate ( $D = 0,4 \text{ d}^{-1}$ ) in einem zusätzlichen Experiment die Zugabe von Stickstoff zu Beginn der Nachtphase erfolgte. Die Ergebnisse zeigten eine nächtliche Synthese von Proteinen auf Kosten intrazellulärer Kohlenstoffspeicher (hauptsächlich Stärke) bei einer zeitgleichen Aufnahme von Stickstoff. Zudem wurde die Teilung der Zellen circa 2 h nach Beginn der Nachtphase vermutet.

Eine Auswertung der beschriebenen experimentellen Daten fand zudem unter dem Konzept der sogenannten aktiven Biomasse statt. Darunter wird die leicht lichtlimitierte Mikroalgenzelle

---

ohne Speicherstoffe (Kohlehydrate und Lipide) verstanden. Dadurch konnten ein konstanter intrazellulärer Stickstoffgehalt von 12 % sowie Proteingehalt von 68 % bestimmt werden.

Basierend auf den experimentellen Daten wurde ein bestehendes Modell des Mikroalgenstoffwechsels um die Fähigkeit zur Bildung intrazellulärer Speicher erweitert. Dabei wurde konkret die Speicherung von Phosphor in sogenannten Granula sowie die Bildung wasserfreier Stärkekörner integriert. Das Modell wurde als Grundlage für die Konzeption und Berechnung der kontinuierlichen Prozessstrategie zur 24 h Abwasseraufbereitung eingesetzt. Dabei wurden die Rückführung von Zellen sowie die Adaption der makromolekularen Zusammensetzung einer Mikroalgenzelle (vor allem Bildung des Energiespeichers Stärke) als Freiheitsgrade zur Beeinflussung des Prozesses berücksichtigt. Der Abwasseraufbereitungsprozess wurde für einen virtuellen Tag aus jeweils 6-stündigen Phasen mit konstanter Lichtintensität bzw. ohne Lichteintrag (Nacht) berechnet. Dabei wurde vor- und nachmittags eine Lichtintensität von  $350 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , mittags eine Lichtintensität von  $700 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  in Abgleich mit realen Wetterdaten festgelegt. Die Abschöpfung und externe Speicherung von stärkereicher Algenbiomasse über die Mittagszeit sowie eine Rückführung dieser Biomasse in der Nacht wurden als Maßnahmen zur vollständigen Aufnahme der Nährstoffe Stickstoff und Phosphor auch in der Nacht identifiziert. Zudem wurde eine Reduktion der verfügbaren Lichtmenge auf jeweils 80 % zur Simulation eines bewölkten Tages im Szenario berücksichtigt und konnte eine ausreichende Abwasserreinigung zeigen.



# Abstract

In the present work, a wastewater treatment strategy using microalgae for continuous 24 h operation was developed. First a suitable microalgae separation system was established which allowed cell recycling during a cultivation. Furthermore, the metabolism of the microalgae *Chlorella vulgaris* (biomass composition and nutrient uptake) was studied during a continuous cultivation applying a light/dark regime of 16 h:8 h. The correlation of different factors limiting the growth and metabolism of microalgae could be visualized in a simplified generic model. The experimental data was evaluated using this model and the related concept of active biomass. This enabled the microalgae-based wastewater treatment process to be optimized.

Membrane filtration was selected for microalgal harvesting, and two separation units (laboratory-scale: *Mini-Harvester* (~100 mL) and pilot-scale: *Harvester* (~12 L)) were successfully developed and implemented. The commercially available membrane module used for the *Harvester* is composed of polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane hollow fibers with a nominal pore diameter of 0.03  $\mu\text{m}$ , arranged in three bundles. The equipment of the *Harvester* with sensors (for flow rates, pressures, turbidity) was designed for research purposes. A reduction of its complexity is easily possible. For laboratory-scale experiments, the *Mini-Harvester* was designed as a scale-down version of the *Harvester* with analogous geometry, using 12 individual hollow fibers of the membrane module. The *Mini-Harvester* could be coupled to the photobioreactor cultivation system available at the institute (cylindrical, illuminated glass reactor, 2 L working volume), allowing to generate an algae-membrane-photobioreactor.

At first the membrane was characterized on the *Harvester* using water and microorganism suspensions (*Saccharomyces cerevisiae*, *Chlorella vulgaris*). The membrane's pure water flux could be determined as a function of the applied transmembrane pressure. A linear relationship between critical flux and biomass concentration was measurable for the filtration of cell-containing suspensions, with dense microalgal cultures (4.8 and 10.0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively) leading to comparatively high critical fluxes of 15.57 and 10.08  $\text{L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ . The membrane enabled a stable and continuous filtration for more than one hour with a microalgae concentration of 40  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  in the retentate. The *Harvester* was classified as highly efficient and low-energy consuming during operation: a microalgae suspension could be concentrated by factor 20 to 40  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  in the retentate requiring only  $1.05\cdot 10^{-2}$  kWh per kg of harvested cells. This predestines the *Harvester* for use in the wastewater sector.

To reduce membrane fouling, the frequency and duration of periodic backflushing (*Mini-Harvester*), pausing (*Harvester*) and membrane aeration (*Harvester*) were investigated. An aeration rate of 1.25 vvm was identified as optimal. Backwashing every 30 min for 60 s enabled efficient filtration. Periodic pauses were effective in reducing fouling for two combinations of frequency and duration (15 min/30 s and 30 min/60 s). Nevertheless, the frequency and duration of both, backwashing and pausing, must be adapted according to the process needs.

The fouling behavior of the individual components of a microalgae suspension was investigated using the *Mini-Harvester*. This revealed that native solutions containing cells, cell debris and

dissolved organic matter show the strongest fouling tendency. However, when cells were present, they protected the membrane from being penetrated by dissolved organic molecules. In this case fouling could be prevented by backwashing and thus was classified as reversible. When real wastewater was used as culture medium, its dissolved organic load ( $32.3 \text{ mg}_{\text{TOC}} \cdot \text{L}^{-1}$ ) contributed significantly to membrane fouling. In comparison, microalgal extracellular polysaccharides showed a lower fouling tendency. Morphological differences between microalgal species had a minor impact on fouling formation. Nutrient limitation in the stationary growth phase of a microalgal culture reduced its fouling tendency compared to cells in the exponential growth phase, despite higher biomass concentrations.

Continuous cultivation of the microalga *Chlorella vulgaris* with a light/dark regime of 16 h:8 h and different dilution rates  $D$  ( $D = 0.0 \text{ d}^{-1}$ - $1.0 \text{ d}^{-1}$  in  $0.1 \text{ d}^{-1}$  steps) revealed that the limiting factors of microalgal growth changed from nutrient to light limitation. The synthetic wastewater used as culture medium exhibited a molar ratio of the nutrients nitrogen and phosphorus of  $\sim 9:1$ , which is below the physiological optimum of  $16:1$ , expressed by the so-called Redfield ratio. Above a threshold of  $D = 0.3 \text{ d}^{-1}$ , an increasing dilution rate led to a decrease in biomass concentration (from  $4.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  to  $1.35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ). This reduction enabled the cells to meet their energy demand enlarged by the imposed growth rate. A complete phosphorus uptake from the synthetic effluent was measurable for all dilution rates tested, demonstrating the ability of *Chlorella vulgaris* to store phosphate (so-called luxury uptake). The limit of the system for the use in wastewater treatment was marked by the threshold value of complete nitrogen uptake of  $D = 0.6 \text{ d}^{-1}$ . Furthermore, the cellular macromolecular composition varied in correlation to the applied flow rate. Nutrient limitation (up to  $D = 0.4 \text{ d}^{-1}$ ) led to the synthesis of carbon-rich storage components (starch and lipids). The night phase was sampled with focus on nutrient uptake and cell composition. For a specific dilution rate ( $D = 0.4 \text{ d}^{-1}$ ), nitrogen was added at the beginning of the night phase in an additional experiment. The results showed a nocturnal synthesis of proteins at the cost of intracellular carbon-rich storage components (mainly starch) with a simultaneous nitrogen uptake. In addition, cell division was assumed to occur approximately 2 h after the beginning of the dark phase.

An evaluation of this experimental data was done applying the concept of the so-called active biomass. This concept describes the slightly light-limited microalgae cell without carbon-rich storage components (carbohydrates and lipids). Thus, a constant intracellular nitrogen content of 12 % and protein content of 68 % could be determined.

Based on the experimental data, an existing model of microalgal metabolism could be improved by demonstrating the cell's ability to synthesize intracellular storages. Specifically, the storage of phosphorus in granule and the synthesis of anhydrous starch were integrated into the model. The model was used as a basis to design and calculate a continuous process strategy for a 24 h wastewater treatment. Cell recycling as well as the adaptation of the macromolecular composition of a microalgae cell (especially the formation of starch as an energy storage) were considered as degrees of freedom to manipulate the process. The wastewater treatment process was calculated for a virtual day consisting of 6 h phases with constant light intensity or without light (night). Considering real weather data, a light intensity of  $350 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  was specified for the morning and afternoon, while a light intensity of  $700 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  was specified for noon. Skimming and external storage of the starch-rich algal biomass at noon and recycling of this

---

biomass at night were identified as tools for the complete uptake of the nutrients nitrogen and phosphorus also at night. In addition, a reduction of the available amount of light to 80 % in each period to simulate cloudy days was considered in the scenario and showed sufficient wastewater treatment.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>i</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>v</b>
<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>ix</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>xiii</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>xix</b>
<b>Abkürzungs- und Formelzeichenverzeichnis.....</b>	<b>xxiii</b>
<b>Vorwort.....</b>	<b>xxvii</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Einführung zum Thema.....	1
1.2 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	2
1.3 Stand der Technik.....	4
1.3.1 Grundlagen des Mikroalgenstoffwechsels.....	4
1.3.2 Mikroalgen in der Abwasseraufbereitung.....	16
1.3.3 Membranverfahren in der Mikroalgenkultivierung.....	26
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>35</b>
2.1 Mikroorganismen.....	35
2.1.1 Mikroalgen Spezies.....	35
2.1.2 Bäckerhefe.....	36
2.2 Medien und Puffer.....	37
2.3 Stammhaltung und Kultivierung in Schüttelkolben.....	38
2.3.1 Stammhaltung.....	38
2.3.2 Kultivierung in Schüttelkolben.....	38
2.4 Analytik.....	39
2.4.1 Medienzusammensetzung.....	40
2.4.2 Biomassequantifizierung.....	41
2.4.3 Biomassezusammensetzung.....	41
2.4.4 Mikroskopie.....	43
2.5 Kultivierungssystem <i>BioEngineering</i> .....	43
2.5.1 Aufbau und Ausstattung des Photobioreaktorsystems.....	43
2.5.2 Satzbetrieb.....	45
2.5.3 Kontinuierliche Kultivierung.....	46
2.5.4 Algen Membran-Photobioreaktor.....	48
2.6 Berechnungen.....	51
2.6.1 Biomasse Zusammensetzung.....	51
2.6.2 Evaluation kontinuierlicher Kultivierungsexperimente.....	52
2.7 Filtrationsexperimente.....	54
2.7.1 Bestimmung des Filtrat-Flux.....	54

2.7.2	Membranwiderstand und -permeabilität .....	54
2.7.3	Kritischer Flux .....	55
2.7.4	Evaluation von Filtrationsprozessen .....	57
2.7.5	Fraktionierte Filtration von Algensuspensionen ( <i>Mini-Harvester</i> ) .....	60
<b>3</b>	<b>Membran Filtrationsanlagen – Entwicklung, Charakterisierung und Betrieb.....</b>	<b>63</b>
3.1	Konzeption und Automatisierung .....	63
3.1.1	Filtrationsanlage <i>Harvester</i> im Pilotmaßstab .....	64
3.1.2	Filtrationsanlage <i>Mini-Harvester</i> im Labormaßstab.....	72
3.2	Charakterisierung Membran .....	80
3.2.1	Spezifikation laut Hersteller .....	80
3.2.2	Membranwiderstand und -permeabilität.....	82
3.2.3	Filtration partikelbeladener Suspensionen – kritischer Flux .....	85
3.3	Reduktion von Membran Fouling – Rückspülen und Pausieren.....	87
3.3.1	Rückspülen .....	87
3.3.2	Pausieren.....	90
3.4	Fouling-Verhalten von Mikroalgensuspensionen .....	93
3.4.1	Einfluss von Wachstumsphase und Biomassekonzentration einer Algenkultur .....	94
3.4.2	Fouling-Beitrag der Komponenten einer Algensuspension verschiedener Mikroalgenspezies .....	98
3.5	Einsatz des <i>Harvester</i> im großen Maßstab.....	100
<b>4</b>	<b>Wachstum und Stoffwechsel von Mikroalgen in kontinuierlichen Kultivierungen auf (synthetischen) Abwässern.....</b>	<b>101</b>
4.1	Mikroalgenstoffwechsel bei Variation der Durchflussrate .....	102
4.1.1	Adaption der makromolekularen Zusammensetzung in An- und Abwesenheit von Licht .....	102
4.1.2	Modell des Mikroalgenstoffwechsels und Konzept der aktiven Biomasse .....	106
4.1.3	Makromolekulare Zusammensetzung der aktiven Biomasse bei Variation der Durchflussrate.....	109
4.2	Kultivierung von Mikroalgen in realem Abwasser.....	111
4.2.1	Semi-kontinuierliche Kultivierung im Außenbereich.....	112
4.2.2	Semi-kontinuierliche Kultivierung unter Laborbedingungen .....	113
<b>5</b>	<b>Prozessstrategie für eine optimierte Nährstoffaufnahme der Abwasseraufbereitung mittels Mikroalgen.....</b>	<b>115</b>
5.1	Konzept der optimierten Abwasseraufbereitungsstrategie für einen 24 h Betrieb.....	116
5.2	Einsatz eines AMPBR zur optimierten Nährstoffaufnahme aus Abwasser durch Mikroalgen .....	120
5.2.1	Zellrückführung im Labormaßstab .....	120
5.2.2	Zellrückführung im Pilotmaßstab .....	124
<b>6</b>	<b>Fazit und Ausblick .....</b>	<b>129</b>
<b>7</b>	<b>Literatur-Anhang.....</b>	<b>133</b>

---

7.1	Advanced near-zero waste treatment of food processing wastewater with water, carbon, and nutrient recovery .....	133
7.2	Characterization of an aerated submerged hollow fiber ultrafiltration device for efficient microalgae harvesting.....	143
7.3	Submerged hollow-fiber-ultrafiltration for harvesting microalgae used for bioremediation of a secondary wastewater .....	160
7.4	Exploring advanced phycoremediation strategies for nutrient recovery from a secondary wastewater source using a largescale membrane photobioreactor system .....	172
7.5	Continuous microalgae cultivation for wastewater treatment - development of a process strategy during day and night.....	183
<b>Literaturverzeichnis.....</b>		<b>197</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>213</b>
8.1	Studentische Arbeiten.....	213
8.2	Material und Methoden.....	214
8.2.1	Medien.....	214
8.2.2	Vorbereitung des Photobioreaktorsystems zur Kultivierung.....	216
8.2.3	Spezifikationen von Geräten, Materialien und Chemikalien.....	217
8.2.4	Auswertung der Filtrations-Daten .....	222
8.3	Filtrationsanlagen .....	223
8.3.1	Technische Zeichnung des <i>Harvesters</i> .....	223
8.3.2	Reinigungsprotokoll <i>Harvester</i> .....	224
8.3.3	Reinigungsprotokoll <i>Mini-Harvester</i> .....	225
8.3.4	Faserhalter am <i>Mini-Harvester</i> .....	226
8.3.5	Regelparameter <i>Mini-Harvester</i> .....	226
8.4	Filtrationsexperimente .....	227
8.4.1	$R_M$ vor Versuchsstart .....	227
8.4.2	Ergänzende Filtrationsdaten .....	230
8.5	Kultivierungsexperimente.....	236
8.5.1	Kontinuierliche Kultivierung Hell/Dunkel-Regime – Satzphase .....	236
8.5.2	Kontinuierliche Kultivierung bei permanenter Beleuchtung.....	236
8.5.3	Kontinuierliche Kultivierung mit Zellrückführung bei permanenter Beleuchtung.....	237
8.5.4	Satzbetrieb und kontinuierliche Kultivierung mit anschließender Zellrückführung in Dunkelphase.....	237
8.6	Modelle und Simulation .....	239
8.6.1	Stationäres metabolisches Fluss-Modell des Mikroalgenstoffwechsels.....	239
8.6.2	Physiologische Zustände und makromolekulare Zellzusammensetzung .....	243
8.6.3	Reaktormodell kontinuierliche Kultivierung.....	244
8.6.4	Berechnung stationäre Zustände der Prozessstrategie zur kontinuierlichen Abwasseraufbereitung im 24 h Betrieb .....	245



# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Schematischer Aufbau einer <i>Chlorella vulgaris</i> Zelle mit Zellorganellen und Speicherkomponenten. ....	4
Abbildung 1-2: Asexuelle Reproduktion der Grünalge <i>Chlorella vulgaris</i> . ....	7
Abbildung 1-3: Unterteilung der oxygenenen Photosynthese in Licht- und Dunkelreaktion mit den zugehörigen Hauptprodukten. ....	8
Abbildung 1-4: Ein- und austretende Stoffströme während einer kontinuierlichen Kultivierung in einem Photobioreaktor im stationären Gleichgewicht. ....	10
Abbildung 1-5: Simulation einer kontinuierlichen Mikroalgen Kultivierung in einem Flachplatten Photobioreaktor mit einseitiger Beleuchtung. ....	11
Abbildung 1-6: Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer <i>C. vulgaris</i> Zelle unter Stickstofflimitierung.....	13
Abbildung 1-7: Mikroskopische Aufnahmen (Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)) von <i>C. vulgaris</i> mit Phosphatakkumulation. ....	14
Abbildung 1-8: Übersicht der einzelnen Reinigungsstufen und Verfahren der konventionellen Abwasseraufbereitung in Kläranlagen in Deutschland.....	17
Abbildung 1-9: Bioökonomie Konzept der Abwasseraufbereitung mittels Mikroalgen.....	19
Abbildung 1-10: Offene Reaktorsysteme (A: Raceway Pond, B: Raceway-Kaskadeneinheiten) im großen Maßstab zur Mikroalgenkultivierung. ....	21
Abbildung 1-11: HRAP (a) und künstlich angelegtes Feuchtbiotop (b) der konventionellen Kläranlage El Toyo in Almería, Spanien (c). ....	22
Abbildung 1-12: Pilotanlage des INCOVER-Projektes bestehend aus drei in Reihe geschalteten Photobioreaktoren (B) sowie schematischer Aufbau der einzelnen Photobioreaktoren (A).....	23
Abbildung 1-13: Demonstrationsanlage des All-gas EU-Projektes (A) zur Biomethanproduktion aus Mikroalgenbiomasse, welche in 2 ha Raceway Ponds (B) in einem kommunalen Abwasser kultiviert werden.....	24
Abbildung 1-14: Mögliche Konfigurationen eines Membran-Photobioreaktors (MPBR) mit internem, getauchtem (A) oder externem (B) Membranmodul. ....	28
Abbildung 1-15: Simulation eines Modell-PBR sowie von MPBR mit interner und externer Filtrationseinheit.....	29
Abbildung 1-16: Mechanismen des Membran Foulings, welches durch Algenzellen und EOM verursacht wird. ....	32
Abbildung 2-1: Mikroskopische Aufnahmen der Grünalge <i>Chlorella vulgaris</i> SAG 211-12 in verschiedenen Maßstäben.....	35
Abbildung 2-2: Algfine-Photobioreaktor mit interner Beleuchtung (A) sowie mikroskopische Aufnahmen der Mikroalge <i>C. vulgaris</i> H14 (B). ....	36

Abbildung 2-3: Dünnschicht-Kaskade zur Mikroalgenkultivierung der Grünalge <i>Chlorella vulgaris</i> R-117.....	36
Abbildung 2-4: Begaste Weithals-Erlenmeyerkolben zur Mikroalgenkultivierung auf einem beleuchteten Schüttler.....	39
Abbildung 2-5: Lichtprofil der Grünalge <i>Chlorella vulgaris</i> im Photobioreaktor Systems <i>BioEngineering</i> entlang des Reaktordurchmessers für verschiedene Biomassekonzentrationen (hier: cX).....	44
Abbildung 2-6: Schema des Photobioreaktor Systems <i>BioEngineering</i> , welches für Kultivierungsexperimente im Labormaßstab eingesetzt wurde.....	46
Abbildung 2-7: Photobioreaktor System <i>BioEngineering</i> , welches für Kultivierungsexperimente im Labormaßstab eingesetzt wurde.....	47
Abbildung 2-8: Membran-Photobioreaktor System <i>BioEngineering</i> mit externer Filtrationseinheit <i>Mini-Harvester</i> , welches für Kultivierungsexperimente im Labormaßstab eingesetzt wurde.....	50
Abbildung 2-9: TMP-Zeit Profile der (A) FS-Methode und (B) MFS-Methode eines moderat gefaulten Membranmoduls eines Membran-Bioreaktors. ....	56
Abbildung 2-10: Schematisches Permeat-Flux- sowie TMP-Zeit Profil der IFS-Methode.....	56
Abbildung 2-11: Definition des Fouling-Widerstandes ( $R_{\text{Fouling}}$ ) während der Membranfiltration partikelbeladener Suspensionen. ....	58
Abbildung 2-12: Rückspüleffizienz ( $\eta_{\text{RS}}$ ) zwischen (n-1) und n Filtrationszyklen mit periodischem Rückspülen zwischen den Zyklen. ....	59
Abbildung 2-13: Definition der Pausiereffizienz ( $\eta_{\text{PA}}$ ) zwischen (n-1) und n Filtrationszyklen mit periodischem Pausieren zwischen den Zyklen. ....	60
Abbildung 2-14: Fraktionierung der Algenbiomasse für die Untersuchung des Fouling-Verhaltens der einzelnen Komponenten. ....	61
Abbildung 3-1: Technische Zeichnungen der Membranfiltrationsanlage <i>Harvester</i> ohne (A, B) und mit (C) Rohr zur Erzeugung eines hydrostatischen Drucks über der Membran. ....	64
Abbildung 3-2: R&I-Fließschema der Filtrationsanlage <i>Harvester</i> (A) sowie Fotos der Anlage inkl. Peripherie mit einer Algensuspension (B) beziehungsweise Wasser (C) gefüllt.....	66
Abbildung 3-3: Verfahrensfließbild mit Anzeige der an der Anlage gemessenen Größen des <i>Harvesters</i> im Prozessleitsystem <i>BioProCon</i> .....	67
Abbildung 3-4: Prozessleitsystem <i>BioProCon</i> , welches für die Anwendung der Filtrationsanlage <i>Harvester</i> konzipiert wurde. ....	68
Abbildung 3-5: Technische Zeichnung (A) und Fotografie (B) der Filtrationsanlage <i>Mini-Harvester</i> . ....	73
Abbildung 3-6: Experimenteller Aufbau der Filtrationsanlage <i>Mini-Harvester</i> im Labormaßstab im vereinfachten Aufbau (A R&I-Fließschema, B Foto). ....	75

---

Abbildung 3-7: Experimenteller Aufbau der Ultrafiltrationsanlage <i>Mini-Harvester</i> im Labormaßstab im automatisierten Aufbau (A R&I-Fließschema, B Foto). .....	78
Abbildung 3-8: Prozessleitsystem <i>BioProCon</i> , welches für den automatisierten Betrieb der Filtrationsanlage <i>Mini-Harvester</i> konzipiert wurde. ....	79
Abbildung 3-9: Für die Filtrationsanlage <i>Harvester</i> eingesetztes Membranmodul Puron ® Hollow Fiber Demo Rows der Firma Koch Membrane Systems. ....	81
Abbildung 3-10: Faserhalter des <i>Mini-Harvesters</i> von vorne (links) und hinten (rechts). ....	82
Abbildung 3-11: Widerstandes der sauberen Membran $R_M$ des Membranmoduls des <i>Harvesters</i> .....	83
Abbildung 3-12: Gemessener Widerstand der sauberen Membran $R_M$ des Membranmoduls des <i>Harvesters</i> in Abhängigkeit der eingestellten Membranbelüftung für ionenhaltige Lösungen und VE-Wasser. ....	84
Abbildung 3-13: Gemessener Widerstand der sauberen Membran $R_M$ des Membranmoduls des <i>Mini-Harvesters</i> . ....	85
Abbildung 3-14: Rückspüleffizienz $\eta_{RS}$ zwischen den Filtrationszyklen (A&B) einer Hefesuspension. ....	89
Abbildung 3-15: Rückspüleffizienz $\eta_{RS,ges}$ zwischen Anfang und Ende der Filtration einer Hefesuspension im <i>Mini-Harvester</i> sowie der währenddessen entstandene gesamte Fouling-Widerstand $R_{Fouling,ges}$ . ....	90
Abbildung 3-16: Evaluation von Dauer und Frequenz des Pausierens als Anti-Fouling Maßnahme mittels einer Hefesuspension ( $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) an der Filtrationsanlage <i>Harvester</i> . ....	92
Abbildung 3-17: Wachstumskurve (Biotrockenmasse, $OD_{750}$ ) der <i>Chlorella vulgaris</i> Kulturen nach drei, fünf oder sieben Tagen. ....	95
Abbildung 3-18: Zeitlicher Verlauf normierten Fouling-Widerstandes $R_{Fouling}/R_{Fouling,0}$ verschiedener Fraktionen einer <i>C. vulgaris</i> Suspension unterschiedlichen Kulturalters einer Filtration am <i>Mini-Harvester</i> . ....	96
Abbildung 3-19: Gesamt-Fouling-Widerstand $R_{Fouling,ges}$ während der ersten beiden Filtrationszyklen der verschiedenen Fraktionen einer <i>C. vulgaris</i> Suspension unterschiedlichen Kulturalters am <i>Mini-Harvester</i> . ....	97
Abbildung 4-1: Charakterisierung der Biotrockenmasse von <i>C. vulgaris</i> während einer kontinuierlichen Kultivierung in einem synthetischen Abwasser mit zunehmender Verdünnungsrate $D$ . ....	103
Abbildung 4-2: Makromolekulare Zusammensetzung der Biotrockenmasse von <i>C. vulgaris</i> während der Nachtphase einer kontinuierlichen Kultivierung in einem synthetischen Abwasser. ....	105
Abbildung 4-3: Vereinfachtes Modell des Mikroalgenstoffwechsels, welches drei Knoten umfasst: Photosynthese, Atmung und Anabolismus. ....	107
Abbildung 4-4: Charakterisierung der aktiven Biomasse von <i>C. vulgaris</i> während einer kontinuierlichen Kultivierung in einem synthetischen Abwasser mit zunehmender Verdünnungsrate $D$ . ....	110

Abbildung 5-1: Virtuelles 24 h Abwasseraufbereitungsprozessschema mit der Mikroalge <i>Chlorella vulgaris</i> bei einer Verdünnungsrate von $0,5 \text{ d}^{-1}$ .....	118
Abbildung 5-2: Biomassequantifizierung (A), makromolekulare Zusammensetzung (B) und Nährstoffkonzentrationen im PBR (C) einer kontinuierlichen Kultivierung ( $D = 1,0 \text{ d}^{-1}$ ) von <i>C. vulgaris</i> SAG 211-12 mit Zellrückführung bei einem Hell/Dunkel-Regime von 16 h:8 h. ....	122
Abbildung 5-3: Makromolekulare Zusammensetzung und Biotrockenmassekonzentration einer kontinuierlichen Kultivierung ( $D = 0,3 \text{ d}^{-1}$ ) von <i>C. vulgaris</i> SAG 211-12 mit Zellrückführung ( $v = 1$ ) bei einem Hell/Dunkel-Regime von 16 h:8 h. ....	123
Abbildung 5-4: Kontinuierliche Kultivierung von <i>Desmodesmus</i> sp. in einem synthetischen Abwasser in miteinander verbundenen „Beutel“-Photobioreaktoren (Phytobags) (A) mit externer Membraneinheit (Harvester) (B) zur Realisierung eines MPBR.....	125
Abbildung 8-1: Temperaturabhängige Dichte $\rho(T)$ von Wasser zwischen 18 und 28 °C: Literaturdaten und polynomielle Ausgleichsfunktion. ....	222
Abbildung 8-4: Eingesetzte Faserhalter (Mini-Faserhalter (A), Midi-Faserhalter (B) und Maxi-Faserhalter (C)) an der Filtrationsanlage <i>Mini-Harvester</i> .....	226
Abbildung 8-5: Ermittlung der kritischen Regelverstärkung $K_{P,krit}$ des PI-Reglers der Filtrationsanlage <i>Mini-Harvester</i> zur Regelung eines konstanten Filtrat-Flux.....	227
Abbildung 8-6: Membranwiderstand $R_M$ vor Versuchsstart der Bestimmung des kritischen Flux an der Filtrationsanlage <i>Harvester</i> .....	228
Abbildung 8-7: Membranwiderstand $R_M$ vor Versuchsstart einer Untersuchung zur Reduktion von Membran-Fouling durch Rückspülen mit einer Hefesuspension an der Filtrationsanlage <i>Mini-Harvester</i> . ....	228
Abbildung 8-8: Membranwiderstand $R_M$ vor Versuchsstart einer Untersuchung zur Reduktion von Membran-Fouling durch Pausieren mit einer Hefesuspension an der Filtrationsanlage <i>Harvester</i> . ....	229
Abbildung 8-9: Membranwiderstand $R_M$ vor Versuchsstart der fraktionierten Filtration einer <i>Chlorella vulgaris</i> Kultur mit der Filtrationsanlage <i>Mini-Harvester</i> . ....	229
Abbildung 8-10: Membranwiderstand $R_M$ vor Versuchsstart der fraktionierten Filtration von Mikroalgenkulturen (D: <i>Desmodesmus</i> und C: <i>Coelastrrella</i> ) mit der Filtrationsanlage <i>Mini-Harvester</i> . ....	230
Abbildung 8-11: Normierte Filtrat-Flux-Zeit Profile ( $J/J_0$ ) der Filtration einer Hefesuspension im <i>Mini-Harvester</i> zum Test der Effektivität des Rückspülens bei unterschiedlicher Dauer und Frequenz. ....	232
Abbildung 8-12: Permeat-Flux-, TMP- und BTM-Zeit Profile der Untersuchung der Effektivität des Pausierens als Maßnahme gegen Membran-Fouling während der Filtration einer Hefesuspension am <i>Harvester</i> .....	233

---

Abbildung 8-13: Filtrations- sowie Pausier-Zyklen Pausiereffizienz ( $\eta_{PA}$ ) zwischen den Filtrationszyklen (A) sowie TMP-Anstieg innerhalb eines Filtrationszyklus (B) für Evaluation von Dauer und Frequenz des Pausierens (5 min/60 s, 15 min/60 s, 15 min/30 s, 30 min/60 s) als Anti-Fouling Maßnahme mittels einer Hefesuspension ( $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) an der Filtrationsanlage <i>Harvester</i> . .....	234
Abbildung 8-14: Ermittlung des kritischen Flux (Flux-Step Methode) der Filtrationsanlage <i>Mini-Harvester</i> bei Einsatz des Mini-Faserhalters mittels einer <i>Chlorella vulgaris</i> Suspension ( $1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). .....	235
Abbildung 8-15: Ermittlung des kritischen Flux (Flux-Step Methode) der Filtrationsanlage <i>Mini-Harvester</i> bei Einsatz des Maxi-Faserhalters mittels einer <i>Chlorella vulgaris</i> Suspension ( $3,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). .....	235
Abbildung 8-16: Prozessparameter (pH, Temperatur, $pO_2$ , Abgaszusammensetzung ( $O_2$ und $CO_2$ )) sowie Biotrockenmassekonzentration einer Satzkultivierung ( $D = 0,0 \text{ h}$ ) von <i>C. vulgaris</i> SAG 211-12 in modifiziertem BG11-Medium bei einem Hell/Dunkel-Regime von 16 h:8 h. ....	236
Abbildung 8-17: Makromolekulare Zusammensetzung und Biotrockenmassekonzentration einer kontinuierlichen Kultivierung von <i>C. vulgaris</i> SAG 211-12 bei permanenter Beleuchtung in modifiziertem BG11-Medium.....	237
Abbildung 8-18: Biotrockenmassekonzentration und optische Dichte ( $OD_{750}$ ) einer Satzkultivierung von <i>C. vulgaris</i> SAG 211-12 bei permanenter Beleuchtung in modifiziertem BG11-Medium.....	238
Abbildung 8-19: Makromolekulare Zusammensetzung einer Satzkultivierung von <i>C. vulgaris</i> SAG 211-12 bei permanenter Beleuchtung nach Zugabe von Stickstoff in den PBR ( $c_{N,PBR, gemessen} = 84,90 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ).....	238
Abbildung 8-20: Vereinfachtes Modell des Mikroalgen Stoffwechsels, welches drei Knoten umfasst: Photosynthese, Atmung und Anabolismus.....	239
Abbildung 8-21: Simulation der scheinbaren spezifischen Wachstumsrate $r_{ABM}$ (Mittelwert) als Funktion der Lichtintensität $I_0$ und Biomassekonzentration $c_{ABM}$ in einem idealen Photobioreaktor. ....	243
Abbildung 8-22: Ergebnisse der Berechnung der virtuellen Abwasseraufbereitungsstrategie in Abhängigkeit der Verdünnungsrate $D$ (Biomassekonzentration und verbleibender Stickstoff im Reaktor).....	249



# Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Überblick der Filtrationsexperimente mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	37
Tabelle 2-2: Übersicht der analysierten Ionen, verwendeten Säulen und Zusammensetzung des Eluenten für die Anionen- sowie Kationenaustauschchromatographie. ....	40
Tabelle 2-3: Parameter (Verdünnungsrate und Rückführverhältnis) der drei Versuchsreihen unter Einsatz des MPBR-Systems. ....	49
Tabelle 2-4: Literaturwerte (inklusive Literaturquellen) für Stickstoff-Gehalte in Proteinen, Pigmenten und Nukleinsäuren aus Mikroalgen. ....	53
Tabelle 2-5: Start-Flüsse und Flux-Schritt Höhen der kritischer Flux Experimente verschiedener Mikroorganismen Spezies und Belüftungsraten der Membranfasern. ....	57
Tabelle 2-6: Überblick der Parameter der fraktionierten Filtration von Algensuspensionen mittels des <i>Mini-Harvesters</i> im einfachen Aufbau in mehreren konsekutiven Filtrationszyklen (Z). ....	62
Tabelle 3-1: Betriebs- und Anlagenparameter zur Ermittlung des Energiebedarfes der Filtrationsanlage <i>Harvester</i> im Pilotmaßstab. ....	71
Tabelle 3-2: Überblick der Experimente sowie Parameter, welche mit dem <i>Mini-Harvester</i> im vereinfachten Aufbau durchgeführt wurden. ....	76
Tabelle 3-3: Kritischer Flux $J_c$ von Bäckerhefesuspensionen ( <i>S. cerevisiae</i> ) und Mikroalgenkulturen (axenische <i>C. vulgaris</i> H14, nicht-axenische <i>C. vulgaris</i> R-117) am <i>Harvester</i> . ....	86
Tabelle 3-4: Getestete Rückspüldauer bei einer Filtration von <i>S. cerevisiae</i> im <i>Mini-Harvester</i> zur Untersuchung der Effektivität des Rückspülens. ....	88
Tabelle 3-5: Zusammenfassung der verschiedenen Ansätze der Untersuchung von Dauer und Frequenz des Pausierens auf die Wirksamkeit der Fouling-Reduktion an der Filtrationsanlage <i>Harvester</i> . ....	91
Tabelle 3-6: Evaluation des zeitlichen Aufwands verschiedener Kombinationen aus Dauer und Frequenz des Pausierens auf die Wirksamkeit der Fouling-Reduktion. ....	93
Tabelle 3-7: Biomassekonzentration intrazellulärer Kohlehydrat- beziehungsweise Pigmentgehalt einer <i>C. vulgaris</i> Kultur. ....	95
Tabelle 4-1: Makromolekulare und elementare Zusammensetzung der Hauptkomponenten einer aktiven <i>Chlorella</i> -Zelle. ....	108
Tabelle 5-1: Biomassekonzentrationen (BTM und ABM) und resultierende Stickstoffkonzentration im Reaktor des virtuellen Abwasseraufbereitungsprozesses der verschiedenen Tageslichtperioden des 24 h Tages. ....	119

Tabelle 5-2: Effizienz des PBR- und MPBR-Systems während jedes Ansatzes im Sommer (So) und Winter (Wi). Verglichen wurden die Nährstoffaufnahme (N, P), Biomasseproduktivität und Abwasseraufbereitungskapazität für verschiedene Ansätze. S1: kontinuierliche Kultivierung ohne Zellrückführung, S2: kontinuierliche Kultivierung mit Zellrückführung und „Real-Life“: kontinuierliche Kultivierung mit Zellrückführung und Anpassung der Biomassekonzentration abhängig der Lichtintensität. ....	126
Tabelle 8-1: Zusammensetzung des verwendeten Bold-Basal Mediums zur Mikroalgenkultivierung nach Bischoff, H. W. & Bold, H. C. 1963, modifiziert nach Starr und Zeikus 1993 und Andersen 2009. ....	214
Tabelle 8-2: Zusammensetzung des 1-fach konzentrierten TAP-Mediums für <i>Chlorella vulgaris</i> nach Gorman und Levine 1965 und Hutner et al. 1950. ....	214
Tabelle 8-3: Zusammensetzung des eingesetzten und modifizierten mBG11-Mediums nach Stanier et al. 1971 zur Mikroalgenkultivierung. ....	215
Tabelle 8-4: Charakterisierung der Wasserqualität des AnMBR Abwassers (Lebensmittelindustrie) sowie des sekundären Abwassers (AnMBR Effluent) (Grossman et al. 2021) .....	215
Tabelle 8-5: A5-Mikro-Nährstoffe Stocklösung (1000 x) – Komponenten, Konzentration in der Stocklösung und finale Konzentration im AnMBR Effluent. ....	215
Tabelle 8-6: Fe-EDTA Stocklösung (1000 x) zur Supplementierung des AnMBR Effluents. ....	216
Tabelle 8-7: Auflistung der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Chemikalien zur Herstellung der verwendeten Kulturmedien und Puffer. ....	217
Tabelle 8-8: Auflistung der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Laborgeräte inklusive Peripherie sowie Verbrauchsmaterialien. ....	218
Tabelle 8-9: Auflistung des in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Photobioreaktorsystems inklusive Peripherie. ....	219
Tabelle 8-10: Spezifikation der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Membran-Filtrationsanlage <i>Harvester</i> inklusive Peripherie. ....	220
Tabelle 8-11: Spezifikation der in der vorliegenden Arbeit Membranfiltrationsanlage <i>Mini-Harvester</i> inklusive Peripherie für die Realisierung eines Membran-Photobioreaktors. ....	221
Tabelle 8-12: Charakterisierung des im <i>Harvester</i> eingesetzten Membranmoduls Puron® Hollow Fiber Demo Rows mit VE-Wasser bei verschiedenen Belüftungsraten. ....	230
Tabelle 8-13: Ergänzende Kultivierungsdaten einer kontinuierlichen Kultivierung von <i>C. vulgaris</i> SAG 211-12 in mBG11-Medium (2-fach) bei permanenter Beleuchtung. ....	236

---

Tabelle 8-14: Ergänzende Kultivierungsdaten einer kontinuierlichen Kultivierung mit Zellrückführung von <i>C. vulgaris</i> SAG 211-12 in mBG11-Medium (4-fach) bei permanenter Beleuchtung.....	237
Tabelle 8-15: Massenanteile der Elemente ( $e_{E,ABM}$ ) C, O N, H, P und S sowie eine empirische Formel einer <i>Chlorella</i> Zelle (aktive Biomasse). Quelle: Safi et al. 2014.....	242



# Abkürzungs- und Formelzeichenverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ABM	Aktive Biomasse
AnMBR	Anaerober Membran-Bioreaktor
BB-Medium	Bold Basal Medium
BG11-Medium	Blue Green 11 Medium
BM	Biomasse
BR	Bioreaktor
BSA	Bovines Serum Albumin
BTM	Biotrockenmasse
C	Kohlenstoff
<i>C. vulgaris</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>
Chl	Chlorophyll
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DOC	gelöster organischer Kohlenstoff (engl.: <i>dissolved organic carbon</i> )
EC	Leitfähigkeit (engl.: <i>electric conductivity</i> )
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EOM	Extrazelluläres organisches Material
IC	Ionenchromatographie
mBG11-Medium	modifiziertes BG11-Medium
MBR	Membran-Bioreaktor
MFC	Massflow Controller
MPBR	Membran-Photobioreaktor
N	Stickstoff
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Ammonium
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	Ammonium-Stickstoff
OD	Optische Dichte
P	Phosphor
PA	Pausieren
PBR	Photobioreaktor
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	Phosphat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R&I Fließschema	Rohrleitungs- und Instrumentenfließschema
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>rounds per minute</i> )
RS	Rückspülen
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
TN	gesamter Stickstoff (engl.: <i>total nitrogen</i> )
TOC	gesamter organischer Kohlenstoff (engl.: <i>total organic carbon</i> )
TP	gesamter Phosphor (engl.: <i>total phosphorus</i> )

TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSS	Gesamt-Schwebstoffe (engl.: <i>total suspended solids</i> )
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
vvm	Volumen Gas pro Volumen begaste Flüssigkeit pro Minute
Z	Zyklus

Formelzeichen-Verzeichnis

Formelzeichen	Bedeutung	Einheit
$\Delta$	Delta	--
$\mu$	spezifische Wachstumsrate	$\text{g}_{\text{BM}} \cdot \text{g}_{\text{BM}}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$
$\mu_{\text{T}}$	temperaturabhängige, dynamische Viskosität	Pa·s
A	Fläche	$\text{m}^2$
Abs	Absorption	--
$A_{\text{I}}$	Beleuchtete Reaktorfläche	$\text{m}^2$
c	Konzentration	$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
CF	Konzentrationsfaktor	--
D	Durchflussrate	$\text{d}^{-1}$
d	Differential	--
E	Energie	kJ oder kWh pro kg oder $\text{m}^3$
F	Volumenstrom	$\text{m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$
h	Förderhöhe	m
HRT	Hydraulische Verweilzeit (engl. <i>hydraulic retention time</i> )	d
$I_0$	Lichtintensität	$\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$
J	Fluss (Filtration)	$\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$ oder $\text{L} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$
k	Kompressibilitätsfaktor Membran	--
l	Länge	m
m	Masse	g
M	Molare Masse	$\text{g} \cdot \text{mol}$
n	Anzahl/Zahl	--
p	Druck	(m)bar oder Pa
$P_{\text{air}}$	Energiebedarf Begasung	$\text{kJ} \cdot \text{s}^{-1}$
$P_{\text{e}}$	Permeabilität	$\text{L} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$
PFD	Photonenflussdichte	$\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$
$P_{\text{p}}$	Förderleistung Pumpe	$\text{kJ} \cdot \text{s}^{-1}$
$P_{\text{r}}$	Produktivität	$\text{mg L} \cdot \text{d}^{-1}$
q	Anteil	%
r	biomassespezifische Rate	$\text{g} \cdot \text{g}_{\text{BM}}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$
R	reaktorspezifische Rate	--
$R^2$	Bestimmtheitsmaß Regression	--
$R_{\text{M}}$	Membran-Widerstand	$\text{m}^{-1}$
RV	Rückführverhältnis	--
S	Substrat Bereitstellung durch das Medium	$\text{mg L} \cdot \text{d}^{-1}$
SF	Skalierungsfaktor	--
SRT	Feststoff Verweilzeit (engl. <i>solid retention time</i> )	d
T	Temperatur	°C
t	Zeit	s
TMP	Transmembrandruck	bar

---

U	Substrat Aufnahme aus dem Medium	mg L·d <sup>-1</sup>
V	Volumen	L
v	membranspezifischer Vorfaktor	--
VRF	Volumetrischer Reduktionsfaktor	--
y	Ausbeutekoeffizient (engl. <i>yield</i> )	--
η	Wirkungsgrad oder Effizienz	--
v	volumetrischer Reduktionsfaktor	--
ρ	Dichte	kg·m <sup>-3</sup>
σ	Absorptionsquerschnitt Zelle	m <sup>2</sup>

#### Verwendete Indices der Formelzeichen

---

Index	Bedeutung
abs	absorbiert
air	Luft (Begasung)
ber	berechnet
c	kritisch (kritischer Flux)
E	Element
f	final/Ende
ges	gesamt
H	hoch (engl. <i>high</i> )
hydro	hydrostatisch
K	Komponente
L	niedrig (engl. <i>low</i> )
M	Membran
Mm	Makromolekül
PBR	Photobioreaktor
Ph	Photon
PA	Pausieren
RS	Rückspülen
th	theoretisch
v	Volumen Bezug (m <sup>3</sup> Filtrat)
W	Wasser
w	Masse Bezug (kg Biomasse Retentat)
C6	C <sub>6</sub> -Körper (Glucose)
PAR	Photosynthetisch aktive Strahlung (engl. <i>photosynthetic active radiation</i> )
Ana	Anabolismus
Akk	Akkumulation
PS	Photosynthese
O2	Sauerstoff
CO2	Kohlenstoffdioxid
Resp	Respiration (Atmung)
0	Start/Beginn



# Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit zwischen Juli 2018 und Oktober 2023 am Institut für Bioverfahrenstechnik des Karlsruher Instituts für Technologie. Ohne die vielfältige Unterstützung verschiedenster Personen wäre diese niemals möglich gewesen, an dieser Stelle möchte ich die Möglichkeit nutzen und ein herzliches Dankeschön aussprechen.

An erster Stelle danke ich Herrn Professor Clemens Posten für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Promotion an seinem Lehrstuhl und das Vertrauen, die vielen wertvollen Anregungen und Hilfestellungen während der Betreuung meiner Arbeit. Mein Dank gilt nicht nur seiner fachlichen, sondern auch menschlichen Unterstützung in allen Belangen meiner Dissertation. Mehr als einmal konnte ich in unseren Gesprächen und Diskussionen neue Perspektiven auf die Zusammenhänge dieser Welt kennen lernen.

Herrn Professor Harald Horn danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und für sein Interesse an der Thematik dieser Arbeit.

Dem BMBF und MOST danke ich für die Finanzierung meines Promotionsprojektes und die dadurch entstandenen Möglichkeiten und Kooperationen. Meinen Projektpartnern in Israel und Bremen danke ich für die gute Zusammenarbeit. Insbesondere meine Kollegen aus Bremen, Song Wang, Rohit Dey, Claudia Thomsen und Laurenz Thomsen möchte ich an dieser Stelle erwähnen. Die mehrfachen Besuche waren jedes Mal eine großartige Erfahrung und Abwechslung.

Man sagt, hinter jedem erfolgreichen Mann steckt eine Frau – bei mir gilt dieses Sprichwort umgekehrt: Ohne die geduldige und hilfsbereite Unterstützung von Christian Steinweg wäre diese Arbeit niemals erfolgreich gewesen. Vielen Dank Christian für all die (technische) Hilfe bei den diversesten Themen zu fast jeder Zeit und dass ich durch dich jetzt auch weiß, was ein Nutzenstein ist!

Meinen lieben Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe Bioverfahrenstechnik Ingrida Melková, Johanna Zander, Rosa Roselló Sastre, Kira Schediwy, Artem Kalinin, Mirco Katzenmeyer, Christoph Howe, Meike Dössel und Katharina Saur möchte ich für die wundervolle Zeit während und außerhalb der Arbeit danken. Danke für eure Unterstützung bei technischen und wissenschaftlichen Fragen und allen sonstigen kleinen und großen Problemen. Jeder von euch hat mir geholfen zu wachsen.

Ein großer Dank geht außerdem an meine Studentinnen und Studenten Ariana Zampieri, Simon Eppel, Paul Klausning, Kristin Neubauer, Joachim Urbanek, Jannis Gasmi, Victoria Bickel und Jonathan Noll. Ohne euren Beitrag und euer Engagement wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen, durch eure Betreuung habe ich sehr viel gelernt!

Ein riesiges Dankeschön gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, für ihre bedingungslose Unterstützung und die Freiheit, genau das zu tun, was mich erfüllt. Zu spüren, wie sehr ihr an mich glaubt, euch für mich über meine Erfolge freut und wie stolz es euch macht hilft mir auch in schwierigen Situationen durchzuhalten und weiterzumachen! An meine Oma und meinen Opa schicke ich ein Dankeschön in den Himmel. Eine liebevollere Begleitung an all meinen Stationen im Leben hätte ich mir nicht wünschen können. Ihr fehlt mir so sehr.

Meinem Mann Memo danke ich, dass er all meine interessanten Monologe über meine Arbeit zu jederzeit brav über sich ergehen hat lassen. Mi Amor - danke, dass du meinen Weg bedingungslos unterstützt und mich immer wieder motivierst, egal wie schwer es auch ist! Mi corazón es perfecto porque tú estás dentro de él.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Tochter Lilia danken. Sie ist mein ehrlicher und gnadenloser Spiegel und zeigt mir Tag für Tag, wie wundervoll und schützenswert diese Welt ist. Danke für die große Freude, die du mir immerzu schenkst, und dass ich durch dich jeden Morgen pünktlich „aufstehn“ konnte.

Gewidmet all den Lichtern am Himmel,  
die ein bisschen heller leuchten,  
wenn ich an sie denke.

Penzberg, 06.12.2023

Franziska Ortiz Tena

# 1 Einleitung

## 1.1 Hinführung zum Thema

Ein Videobeitrag in der Tagesschau® von August 2023 schließt mit dem Satz „Algen – ein Rohstoff der Zukunft für Ernährung und Klima“ (Tagesschau.de 2023). Kommentare wie dieser stehen stellvertretend für das stetig wachsende Interesse von Forschung, Industrie und Politik an (Mikro)Algen und ihrem Potential als klimafreundliche Zellfabriken. Aufgrund der Fixierung von atmosphärischem CO<sub>2</sub>, der Nutzung natürlichen Sonnenlichts als Energiequelle sowie ihrer zellulären Zusammensetzung stehen Mikroalgen wie kaum ein anderer Organismus für Nachhaltigkeit und ressourcenschonende Stoffproduktion. Mit einer im Vergleich zu Nutzpflanzen 10-fach höheren Biomasseproduktion sind sie höheren Pflanzen überlegen. Zudem steht ihre Produktion nicht in direkter Nutzungskonkurrenz zur Herstellung von Lebens- und Futtermitteln, da sie auf degradierten und nicht fruchtbaren Flächen kultiviert werden können. (Abdelfattah et al. 2023; Gupta und Bux 2019) Damit sind Mikroalgen ein vielversprechender Lösungsansatz für die Herausforderungen des 21. Jahrhunderts wie die Folgen des menschengemachten Klimawandels. Zudem können sie als alternative Technologien für bestehende (Industrie)Prozesse eingesetzt werden, ein Beispiel hierfür ist die Aufarbeitung von belasteten Gewässern oder Abwässern (Abdelfattah et al. 2023).

Die in Abwässern enthaltenen Komponenten werden generell in organische, anorganische (hauptsächlich Stickstoff und Phosphor) und sonstige Bestandteile (Toxine, Schwermetalle, etc.) eingeteilt, welche vor der Einleitung in natürliche Gewässer zu entfernen sind (Gupta und Bux 2019). Heterotrophe Mikroorganismen werden in konventionellen Kläranlagen sehr effektiv zur Eliminierung kohlenstoffhaltiger Substanzen eingesetzt. Die Nährstoffe Stickstoff und Phosphor können zwar mittels mikrobieller und chemischer Verfahren aus Abwässern entfernt werden, allerdings werden diese im Zuge dessen in die Umwelt und Atmosphäre freigesetzt und sind damit für eine direkte Nutzung verloren. Für einen Einsatz von Stickstoff beispielsweise als Düngemittel muss dieser energieaufwändig aus der Atmosphäre rückgewonnen werden (Haber-Bosch-Verfahren). Neben Stickstoff ist Phosphor ein Hauptbestandteil der in der konventionellen Landwirtschaft eingesetzten Dünger. Phosphor wird aus natürlichen Quellen abgebaut, welche Studien zufolge bis zum Jahr 2070 versiegen könnten (Nagarajan et al. 2020) – ein effizientes Recycling der endlichen Ressource aus Abwässern ist also unabdingbar.

Der Einsatz von Mikroalgen zur Aufbereitung von Abwässern wurde bereits in den 1960er Jahren beschrieben (Oswald et al. 1957). Mikroalgen sind in der Lage, eine Vielzahl an teilweise toxischen Komponenten an ihrer Zelloberfläche zu absorbieren, abzubauen oder in die Zelle aufzunehmen. Hierzu zählt die Aufnahme der Nährstoffe Stickstoff und Phosphor in die Zelle und deren Fixierung in zellulären Makromolekülen wie Proteine oder Nukleinsäuren. Damit sind sie ein idealer Organismus für neue Konzepte in der konventionellen Abwasseraufbereitung. Neben der Klärung von Abwässern kann durch deren Einsatz zudem der finanzielle Aufwand der (großtechnischen) Mikroalgenkultivierung gesenkt werden, da die Bereitstellung

kostenintensiver Kulturmedien entfällt. Die effiziente Nährstoffaufnahme verschiedener Mikroalgenpezies aus Abwässern unterschiedlicher Herkunft war und ist Gegenstand aktueller Studien (Li et al. 2019; Abdelfattah et al. 2023). Dabei werden unter photoautotrophen Kultivierungsbedingungen Effizienzen von >99 % für die Entfernung von Stickstoff und Phosphor aus den Abwässern angegeben (Xin et al. 2010). Vor allem die Fähigkeit von Mikroalgen zur Speicherung von Phosphor (dem sogenannten *luxury uptake*) spielt dabei eine wichtige Rolle (Solovchenko et al. 2019b), wodurch die Anwendung auf eine Vielzahl von Abwässern mit unterschiedlichen Verhältnissen der beiden Nährstoffe möglich ist. Auch werden hohe Konzentrationen an Stickstoff und Phosphor von den Zellen toleriert und mit hoher Effektivität aufgenommen. (Beuckels et al. 2015) Zudem ist die Valorisierung der entstehenden Mikroalgenbiomasse ein weiterer Schwerpunkt der Forschung. Dabei wird der Fokus vor allem auf die Erzeugung lipidreicher Zellen gelegt, welche im Anschluss für die Produktion von Biokraftstoffen eingesetzt werden können. (Al hattab 2015) Oftmals werden die zugrunde liegenden Studien allerdings unter Laborbedingungen durchgeführt. Zwar wird versucht, durch die Kultivierung mit Licht- und Dunkelphasen natürliche Bedingungen zu simulieren, zumeist werden die Stoffwechselfvorgänge allerdings nur während der Lichtperioden untersucht. Zu den metabolischen Aktivitäten von Mikroalgen bei Dunkelheit gehört der Abbau intrazellulärer Kohlenstoffspeicher, welche bei Licht synthetisiert wurden (León-Saiki et al. 2017). Zudem unterliegt der Zellzyklus einiger Spezies einer inneren Uhr, wobei die Zellteilung in der Nacht stattfindet (Mittag 2001). Die Aufnahme von Nährstoffen bei Dunkelheit wird bislang bei vielen Forschungsarbeiten nicht berücksichtigt und bildet daher einen erheblichen Untersuchungsbedarf.

Um mit konventionellen Prozessen der Abwasseraufbereitung konkurrieren zu können, müssen mikroalgenbasierte Verfahren kontinuierlich ausgelegt werden, um Abwässer sowohl am Tag als auch in der Nacht zu klären. Bislang werden Mikroalgen großtechnisch zumeist im Satzbetrieb kultiviert – unabhängig der Anwendung. Kontinuierliche Kultivierungen werden oftmals aufgrund des höheren apparativen und regulatorischen Aufwands und der damit verbundenen Kosten vermieden. (Masojídek et al. 2023) Entsprechend sind vor der Etablierung solcher Verfahren viele offene Fragen zu beantworten. Im Fokus steht dabei die Anpassung des Mikroalgenstoffwechsels an variierende Verfügbarkeiten von Licht und Nährstoffen während einer kontinuierlichen Betriebsweise.

Mikroalgen können also zurecht als „Rohstoff der Zukunft für Ernährung und Klima“ bezeichnet werden. Im Jahr 2021 wurden bereits  $4 \cdot 10^4$  Tonnen an Algenbiomasse kommerziell produziert, wodurch circa  $2 \cdot 10^4$  t Kohlenstoff fixiert werden konnten. (Masojídek et al. 2021) Durch eine breitere Anwendung von Mikroalgen in der Abwasseraufbereitung kann diese Zahl vervielfacht werden und damit einen wesentlichen Beitrag zur Reduktion von Treibhausgasen in der Atmosphäre leisten. Für alle kommenden Generationen soll die vorliegende Arbeit einen Beitrag leisten, einen Schritt in eine nachhaltige Zukunft zu gehen.

## 1.2 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die vorliegende Arbeit war Teil eines internationalen Projektes (AnMBRA: **A**naerobic **M**embrane **B**io**R**eactor and **A**lgae production for Industrial Wastewater Recycling) zur Realisierung eines mehrstufigen Verfahrens zur kontinuierlichen Abwasseraufbereitung aus der Lebensmit-

telindustrie. Nach dem Passieren eines anaeroben Membranbioreaktors zur Entfernung der Kohlenstoffquellen, soll das so entstandene sekundäre Abwasser in einem Mikroalgen-Photobioreaktor von den Nährstoffen Stickstoff und Phosphor gereinigt werden. Diese mikroalgenbasierte Reinigungsstufe ist Ausgangspunkt der Konzepte und Experimente dieser Arbeit. Dabei ist das Ziel die Ausarbeitung einer flexiblen Prozessstrategie für eine kontinuierliche Abwasseraufbereitung und die damit verbundene Optimierung der Nährstoffaufnahme durch die Mikroalgen während des Bioprozesses. Die Herausforderung liegt dabei in der vollständigen Entfernung der Nährstoffe aus dem sekundären Abwasser unabhängig der Nährstoffbelastung des Abwassers sowie der klimatischen Umweltbedingungen (beispielsweise Temperatur, Lichtintensität und Lichtstunden). Außerdem soll die Abwasseraufbereitung als kontinuierlicher 24 h-Prozess realisiert werden, wodurch der Mikroalgenmetabolismus während der Nachtphase im Fokus steht. Als Freiheitsgrad zur Beeinflussung eines solchen Prozesses soll die Rückführung von Zellen in den kontinuierlich betriebenen Photobioreaktor angewandt werden. Die Flexibilität im Mikroalgenstoffwechsel zur Anpassung an verschiedene Bedingungen bezüglich Nährstoff- und Lichtverfügbarkeit wird als zweiter Freiheitsgrad eingesetzt.

Zunächst steht die Entwicklung einer geeigneten Methode zur Mikroalgenabtrennung im Vordergrund. Die Abtrenneinheit soll kontinuierlich arbeiten und zudem an einen Photobioreaktor koppelbar sein, um so eine Zellrückführung während der Kultivierung zu ermöglichen. Für Vor-Ort-Versuche am Institut soll eine Laboranlage konzipiert werden, welche an das vorhandene Photobioreaktorsystem angeschlossen werden kann. Außerdem wird für Experimente im Pilotmaßstab in Zusammenarbeit mit Projektpartnern eine Abtrennanlage im Pilotmaßstab gewünscht. Neben der Konzeptualisierung der Abtrenneinheit ist deren Charakterisierung ein wesentlicher Bestandteil der Versuche der vorliegenden Arbeit. Dabei soll die Untersuchung des Membran-Fouling der zu trennenden Mikroalgensuspensionen sowie die Reduktion von Fouling im laufenden Betrieb Schwerpunkte sein.

Die Adaption des Stoffwechsels der Mikroalge *Chlorella vulgaris* auf verschiedene Status bezüglich Nährstoff- und Lichtverfügbarkeiten soll im Zuge einer kontinuierlichen Kultivierung im Labormaßstab mit ansteigender Verdünnungsrate untersucht werden. Ein besonderer Fokus liegt auf den metabolischen Aktivitäten sowie der Nährstoffaufnahme der Mikroalge während der Nachtphasen. Die Ergebnisse soll die Identifikation verschiedener Limitierungszustände hinsichtlich Lichts und Nährstoffen während der kontinuierlichen Prozessführung sowie die daraus resultierenden Veränderungen der zellulären Zusammensetzung erlauben. Basierend auf den experimentellen Daten soll im Anschluss ein vereinfachtes generisches Modell des Mikroalgenstoffwechsels sowie eine theoretische aktive Mikroalgenzelle abgebildet werden. Das Modell dient im Anschluss als Grundlage für die Erarbeitung einer Prozessstrategie für die kontinuierliche Abwasseraufbereitung im Laufe von 24 h. Dabei steht die flexible Anpassung der Prozessführung an unterschiedliche Lichtverhältnisse im Vordergrund. Als Freiheitsgrade soll die Zellrückführung in den Photobioreaktor sowie die Zellzusammensetzung der Mikroalgen berücksichtigt werden.

## 1.3 Stand der Technik

### 1.3.1 Grundlagen des Mikroalgenstoffwechsels

#### 1.3.1.1 Grünalge *Chlorella vulgaris*

Der Begriff Mikroalge beschreibt eine diverse Gruppe von zumeist aquatischen, Photosynthese betreibenden Mikroorganismen mit einer immensen Biodiversität. Die sphärische, flagellenlose Grünalge *Chlorella vulgaris* (*C. vulgaris*) ist als Bodenalge oder Süßwasserbewohner in verschiedenen Habitaten zu finden und in der wissenschaftlichen Forschung als Modellorganismus anerkannt. Weiterhin ist sie als Nahrungsergänzung im Handel etabliert. Der Zelldurchmesser dieser Mikroalge variiert zwischen 2 und 10  $\mu\text{m}$ , wobei ein Einfluss des Zellzyklus (vgl. Kapitel 1.3.1.3) sowie von Umweltbedingungen (Nährstoffverfügbarkeit, vgl. Kapitel 1.3.1.5) auf den Zellradius nachgewiesen wurde. (van Hoek 1993; Safi et al. 2014; Coronado-Reyes et al. 2022; Yamamoto et al. 2004; Richmond und Hu 2013)

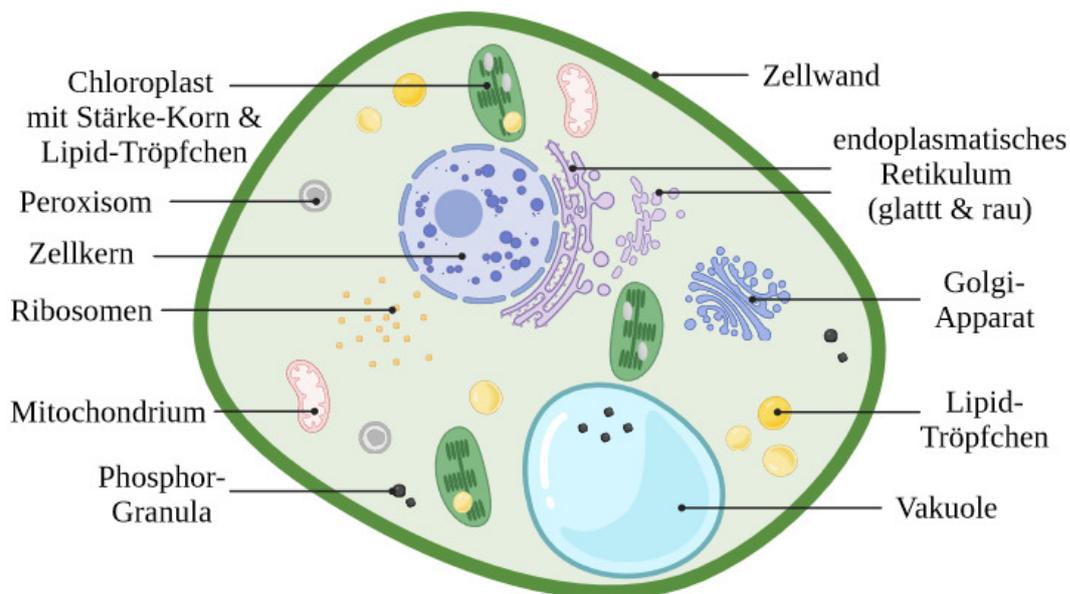


Abbildung 1-1: Schematischer Aufbau einer *Chlorella vulgaris* Zelle mit Zellorganellen und Speicherkomponenten. Quelle: Erstellt von Jonathan Noll (2021) mit BioRender.com nach Safi et al. 2014, modifiziert von Franziska Ortiz Tena (2023) nach Solovchenko et al. 2019a und Procházková et al. 2014.

Als Eukaryot ist eine *C. vulgaris* Zelle mit verschiedenen Zellorganellen ausgestattet (Abbildung 1-1), welche von einer Zellwand umschlossen sind. Chloroplasten sind dabei das Organell der Photosynthese. Sie sind von einer Doppelmembran umhüllt, welche das Stroma (plasmatische Phase) umschließt. Das Stroma wiederum ist von einem Membransystem, der Thylakoidmembran, durchzogen. In der Membran der Thylakoide sind Pigmente (hauptsächlich der grüne Farbstoff Chlorophyll) eingelagert, welche für die Absorption von Photonen verantwortlich sind und damit die Lichtreaktion der Photosynthese ermöglichen. Weiterhin enthalten die Chloroplasten von Grünalgen Plastide, innerhalb derer Stärkekörner um das sogenannte

Pyrenoid herum gebildet werden. Das Pyrenoid beschreibt eine Anhäufung von RuBisCO (Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase), dem wichtigsten Enzym im Calvin-Benson-Zyklus der Dunkelreaktion der Photosynthese zur Fixierung von CO<sub>2</sub>. Die in Chloroplasten enthaltene DNA codiert lediglich für eine geringe Zahl an Genen, da der Großteil des Genoms bei eukaryotischen Algen in den Nukleus (Zellkern) transferiert wurde. Die Mitochondrien von Grünalgen wie *C. vulgaris* ähneln denjenigen höherer Pflanzen, dort finden metabolische Prozesse zur Energiebereitstellung (Atmung) für Wachstum und Erhaltungstoffwechsel statt. Der hier ablaufende Citratzyklus liefert außerdem Kohlenstoffgerüste, welche als Vorstufen für die Synthese zellulärer Komponenten wie Pigmente, Aminosäuren oder Nucleotide eingesetzt werden. Eukaryotische Algen enthalten außerdem eine oder mehrere Vakuolen, welche als Speicherort für Nährstoffe (Phosphor) oder Stoffwechselprodukte (wasserfreie Stärke oder Lipide) dienen und außerdem einen positiven osmotischen Druck innerhalb der Zelle aufrechterhalten. (Safi et al. 2014; Richmond und Hu 2013)

### 1.3.1.2 Makromolekulare Zusammensetzung von *Chlorella vulgaris*

Hinsichtlich der in *Chlorella vulgaris* vorkommenden Biomolekülen wird hauptsächlich zwischen Proteinen, Polysacchariden, Lipiden, Pigmenten und Nucleinsäuren unterschieden, welche im Zuge der vorliegenden Arbeit als die makromolekulare Zusammensetzung einer Mikroalgenzelle definiert wurden. Kohlehydrate und Lipide werden weiterhin in funktionelle (hauptsächlich strukturelle) Moleküle und Speicherkomponenten unterteilt, welche bis zu 70 % des Trockengewichtes einer Mikroalgenzelle ausmachen können (Schediwiy et al. 2019; Procházková et al. 2014). Die drei Makromoleküle Kohlehydrate, Lipide und Proteine haben zusammen den größten Gewichtsanteil an einer Mikroalgenzelle.

Kohlehydrate liegen in Mikroalgenzellen als reduzierende Einfachzucker oder Polysaccharide vor, abhängig der zu erfüllenden biologischen Funktion. Strukturpolysaccharide wie Cellulose sind in der Zellwand lokalisiert. Das Polysaccharid mit dem größten Anteil ist Stärke, welche aus Amylose und Amylopektin besteht und als Kohlenstoffspeicher fungiert. Als großes Molekül ist Stärke in Form eines Kornes im Lichtmikroskop in einer Mikroalgenzelle sichtbar. Außerdem werden Kohlehydrate in Form von Glykoproteinen als Signalmoleküle von der Algenzelle eingesetzt. (Safi et al. 2014; Ortiz-Tena et al. 2016; Richmond und Hu 2013)

Lipide können zwischen 5-40 % der Biotrockenmasse einer *C. vulgaris* Zelle ausmachen (Safi et al. 2014). Ihre Synthese findet in den Chloroplasten statt. Lipide werden in der Zelle als Hauptbestandteil von Membranen eingesetzt, zudem wurden auch Glycolipide, Wachse, Phospholipide, (freie) Fettsäuren sowie Triacylglyceride nachgewiesen. Letztere werden hauptsächlich unter ungünstigen Wachstumsbedingungen als Kohlenstoff- und Energiespeicher gebildet und als Tröpfchen im Chloroplasten oder Zytosol gespeichert (vgl. Abbildung 1-6 in Abschnitt 1.3.1.5). (Safi et al. 2014; Borowitzka et al. 2016; Richmond und Hu 2013)

Proteine spielen in vielen Prozessen einer Mikroalgenzelle eine essenzielle Bedeutung, so sind sie die hauptsächlichsten Katalysatoren von Stoffwechselreaktionen und damit wesentlich am Zellwachstum beteiligt. Zudem regulieren Proteine zelluläre Aktivitäten, dienen als chemische Botenstoffe und sind an Abwehrmechanismen beteiligt. In der Literatur werden für *C. vulgaris* oftmals Proteingehalte zwischen 42-58 % genannt, Unterschiede werden zumeist durch verschiedene Wachstumsbedingungen oder Wachstumsphasen begründet. (Safi et al. 2014; Rich-

mond und Hu 2013) Bei der Interpretation der intrazellulären Proteinmenge wird selten der Gehalt an Speicherstoffen (Stärke und Lipide) berücksichtigt, welche ab einem Schwellenwert eine scheinbare Verringerung des Proteingehaltes in einer Zelle verursachen. Das Konzept der aktiven Biomasse bezieht diese Tatsache in die Analyse der makromolekularen Zusammensetzung mit ein und wird in Kapitel 4.1.2 im Detail beschrieben. Durch eine virtuelle Subtraktion der Gehalte an Speicherstoffen wird lediglich die aktiv metabolisierende Zelle betrachtet, deren Zusammensetzung im gesunden Zustand mehr oder minder konstant und damit unabhängig der Umweltbedingungen ist. Die Antwort auf variable Bedingungen von außen ergibt sich durch die Akkumulation von Kohlehydraten bzw. Lipiden bzw. der Funktionalität von Proteinen und nicht durch deren Menge.

Das in *C. vulgaris* dominante Pigment ist Chlorophyll. Chlorophylle (a und b) sind die farbgebenden Komponenten in der Thylakoidmembran in *C. vulgaris* und machen 1-2 % der Biotrockenmasse aus. Gemeinsam mit Carotinoiden spielen die Pigmente eine zentrale Rolle in der Absorption von Photonen im Chloroplasten. (Safi et al. 2014) Zum intrazellulären Gehalt an Nukleinsäuren in *C. vulgaris* ist wenig bekannt. Als Schätzwert der kumulierten Menge an DNA und RNA kann 10 % der gemessenen Proteinmenge angenommen werden, wobei der Gehalt (ribosomale RNA) bei geringen Wachstumsraten sinkt. (Inomura et al. 2020)

Der exakte Anteil eines jeden Makromoleküls in der Mikroalgenzelle variiert abhängig von Umweltbedingungen sowie dem Zellzyklus. Beide Aspekte werden folgend in den Kapiteln 1.3.1.3 und 1.3.1.5 vertieft. Die biochemische Zusammensetzung von *Chlorella vulgaris* macht die Grünalge prädestiniert für eine Anwendung in verschiedensten Wirtschaftszweigen wie der Lebens- und Futtermittelindustrie, zur Produktion von Biokraftstoffen oder aber zur Abwasseraufbereitung. Das Potential von Mikroalgen – speziell von *C. vulgaris* – in der Abwasseraufbereitung ist in Kapitel 1.3.2 beschrieben.

### **1.3.1.3 Zellzyklus und zirkadiane Rhythmen von Mikroalgen**

Die Biochemie sowie die metabolischen Aktivitäten einer Mikroalgenzelle sind kein starrer Zustand, sondern unterliegen vielmehr einer durch Umweltbedingungen beeinflussten Dynamik. Hierzu zählt der Zellzyklus inklusive der dafür vorbereitenden Zellaktivitäten. Das Ziel des Zellzyklus ist die asexuelle Reproduktion aller zellulären Strukturen zur Bildung neuer Tochterzellen. Diese werden auch als Autosporen bezeichnet und haben bereits das charakteristische Aussehen der Mutterzelle. Die gesamte zelluläre Reproduktion von *Chlorella vulgaris* geschieht innerhalb von 24 h durch Autosporelation (Abbildung 1-2, van Hoek 1993), wobei mehr als zwei Tochterzellen entstehen können. Die Tochterzellen reifen während der Wachstumsphase in der Zellwand der Mutterzelle heran und dehnen diese aus (Abbildung 1-2 b). Nach der Reifephase trennen sich 4 bis 16 Autosporen in der Teilungsphase von der Mutterzelle ab (Abbildung 1-2 c). Dadurch ist eine Veränderung in der Zellgröße für die unterschiedlichen Zellzyklusphasen messbar. Das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit von Licht hat dabei einen wesentlichen Einfluss auf den zeitlichen Ablauf des gesamten Zellzyklus. Das Zellwachstum ist dabei an die Photosynthese gekoppelt, während der eigentlichen Zellteilung (Mitose) hingegen ist die Photosynthese abgeschaltet. (Yamamoto et al. 2004; Coronado-Reyes et al. 2022)

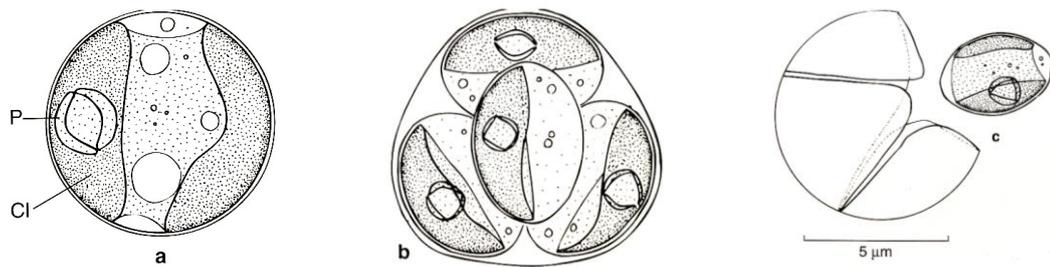


Abbildung 1-2: Asexuelle Reproduktion der Grünalge *Chlorella vulgaris*. a: Einzellige, kokkale vegetative *C. vulgaris* Zelle (im Bild: Cl - Chloroplast, P - Pyrenoid), b-c: Bildung von Autosporen durch *C. vulgaris* zur asexuellen Replikation. Quelle: van Hoek 1993.

Vor etwa 70 Jahren gelang es zum ersten Mal, eine Mikroalgenkultur der Gattung *Chlorella* als synchrone Kultur zu kultivieren und damit deren Zellzyklus zu erforschen und Zellzyklusmodelle zu etablieren. In einer solchen Synchronkultur durchlaufen alle Zellen die verschiedenen Phasen des Zellzyklus bis hin zur Teilung zeitgleich, sodass die Zellzahl im zeitlichen Verlauf schubweise zunimmt. Die Zellteilung wird durch eine Zunahme der Zellgröße angekündigt, hervorgerufen durch den Aufbau aller essenzieller, funktioneller Strukturen/Organelle und der Akkumulation von Speicherstoffen. Dieser Teil des Zellzyklus ist eine Art kritischer, regulatorischer Mechanismus und entscheidet, ob die Zellteilung auch im Dunkeln, bzw. ohne externe Energieversorgung stattfinden kann. Konnten alle notwendigen Vorbereitungen getroffen werden, wird die Zellteilung eingeleitet. Ist dies aufgrund ungünstiger Umweltbedingungen nicht der Fall, wird die Teilung angehalten. Dieser kritische Punkt im Zellzyklus wird oftmals als „Umschlagpunkt“ (CP, engl. *commitment point*) bezeichnet, wobei dieser Mechanismus für verschiedene Vorgänge wie DNA-Replikation, Zellkernteilung sowie Zellteilung durchlaufen werden muss. Nach erfolgreichem Passieren der CPs wird die DNA-Replikation eingeleitet, gefolgt von der Teilung des Zellkernes sowie der Zelle. (Borowitzka et al. 2016)

In der Biologie sind zyklische Mechanismen oder Abläufe wie der oben beschriebene Zellzyklus häufig zu finden. Zirkadiane Rhythmen sind eine Art „innere Uhr“, also eine Anpassung von Organismen an tägliche auftretende Ereignisse in deren Umwelt (Licht, Hell-/Dunkelphasen, Temperatur) und treten bei gleichbleibenden Bedingungen etwa alle 24 h auf (Goto und Johnson 1995). Dennoch können sie auch bei Abwesenheit der Umweltfaktoren aktiv bleiben, wie beispielsweise einer Umstellung von intermittierender auf kontinuierliche Beleuchtung (Borowitzka et al. 2016). Erfolgt ein inverser Wechsel des Lichtregimes aus Hell-/Dunkelphasen, so kommt es nach einer Umstellungsphase allerdings zu einer Anpassung der zirkadianen Rhythmen (Mittag 2001). In Mikroalgen beeinflussen zirkadiane Rhythmen eine Vielzahl metabolischer Aktivitäten, wie beispielsweise der Stickstoffassimilation und -fixierung, der Photosynthese, der Pigmentsynthese oder der Chemotaxis. (Borowitzka et al. 2016) Eine zirkadiane Anpassung der Photosyntheseaktivität in *C. vulgaris* wurde von SOROKIN und MYERS ermittelt. Diese sank mit zunehmender Dauer der Lichtphase und erreichte ein Minimum, welches mit der beginnenden Zellteilung zusammen fiel (SOROKIN und MYERS 1957). Bezüglich des ebenfalls innerhalb von 24 h auftretenden Zellzyklus bleibt offen, ob dieser einem eigenständigen zirkadianen Rhythmus unterliegt, durch eine Art Zellteilungsrythmus gesteuert wird oder aber durch eine Interaktion der Faktoren. Aus verschiedenen Studien ist bekannt, dass der

Zellzyklus und die dazugehörigen Stoffwechselaktivitäten zirkadianen Rhythmen unterliegen, welche an die Dauer von Licht- und Dunkelphasen angepasst sind. Die Teilung findet dabei zumeist in Abwesenheit von Licht – sprich der physiologischen Nacht – statt. (Mittag et al. 2005; Suzuki und Johnson 2001; León-Saiki et al. 2017; Borowitzka et al. 2016). Bei einer kontinuierlichen Beleuchtung der Mikroalgenzellen wird die Zellteilung während der vermeintlichen Nacht ausgeführt (Winter et al. 2013a). Für eukaryotische Mikroalgen ist die Zellteilung häufig während der Nacht synchronisiert (Winter et al. 2013b).

Die biochemische Zusammensetzung einer Mikroalgenzelle variiert während eines Zellzyklus aufgrund der bereits beschriebenen Abläufe. Für die Grünalge *Neochloris oleoabundans* wurde diese Anpassung der intrazellulären Makromoleküle bei kontinuierlicher Beleuchtung untersucht (Winter et al. 2013b). Die Zellteilung wurde während der hypothetischen Nacht nachgewiesen, wobei maximale Gehalte für Stärke, Lipide und Proteine direkt vor der eigentlichen Teilung gemessen wurden. Der Proteingehalt erreichte ein Minimum direkt nach Abschluss des Zellzyklus. Eine Reduktion der intrazellulären Proteinmenge kann demnach als Indiz für eine Teilungsaktivität von Mikroalgenzellen herangezogen werden. Auch unter Nährstofflimitierungen (Stickstoff) wurde ein Zusammenhang der makromolekularen Zusammensetzung mit dem Zellzyklus ermittelt (Winter et al. 2014). Allerdings war der Anteil an teilenden Zellen geringer, im Vergleich zu einer nicht-limitierten Kultur wurde der Zellzyklus an den verschiedenen Umschlagspunkten aufgrund der Stickstofflimitierung pausiert. Die Biomassezusammensetzung bei der Anwendung von Hell-/Dunkelzyklen entsprach derjenigen bei kontinuierlicher Beleuchtung mit Ausnahme eines verringerten Stärkegehaltes (Winter et al. 2017a). Eine Variation der Dauer der Lichtperiode führte zwar zu einer Variation in der Biomassezusammensetzung (hauptsächlich Zunahme des Stärkegehaltes), hatte aber keine Auswirkung auf die zirkadianen Aktivitäten (Winter et al. 2017b).

### 1.3.1.4 Photosynthese und photoautotrophe Kultivierung

*“It’s not love or money that makes the world go round, it’s photosynthesis”*  
(Richmond und Hu 2013)

Vor circa 3,4 Billionen Jahren wurde die oxygene Atmosphäre der Erde durch sauerstoffproduzierende Organismen geschaffen. Photoautotrophe Organismen nutzen die Energie des Sonnenlichts und wandeln dieses zusammen mit anorganischen Komponenten zu organischen Substanzen um. Bei diesem, besser als Photosynthese bekannten Prozess, entsteht Sauerstoff als Nebenprodukt, welches in die Umwelt entweicht. Die oxygene Photosynthese wird oftmals als durch Lichtenergie getriebene Redoxreaktion verstanden. Dabei werden die Abläufe in die Licht- und Dunkelreaktion eingeteilt (Abbildung 1-3).

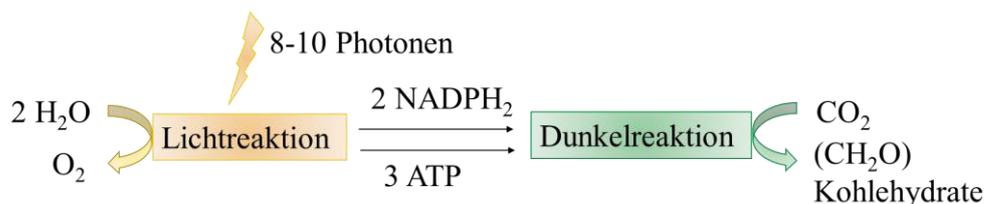


Abbildung 1-3: Unterteilung der oxygenen Photosynthese in Licht- und Dunkelreaktion mit den zugehörigen Hauptprodukten. Quelle: eigene Darstellung nach Richmond und Hu 2013 und Masojidek et al. 2021.

Lichtenergie wird durch Chlorophyll-Moleküle in den Chloroplasten gesammelt und in der Lichtreaktion an photosynthetisch aktiven Membranen in chemische Energie gebunden. Dabei werden ein biochemischer Reduktant ( $\text{NADPH}_2$ ) und eine hoch energetische Komponente (ATP) erzeugt. Im Stroma des Chloroplasten findet die Dunkelreaktion statt, hier werden  $\text{NADPH}_2$  und ATP in einer sequenziellen biochemischen Reduktion von Kohlenstoffdioxid ( $\text{CO}_2$ ) zu Kohlenhydraten ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) eingesetzt. Die Umwandlung von  $\text{CO}_2$  zu Kohlehydraten findet in vier Reaktionsschritten statt, welche im sogenannten Calvin-Benson-Zyklus zusammengefasst werden. (Richmond und Hu 2013; Masojídek et al. 2021) In der Dunkelreaktion der Photosynthese werden theoretisch 8-10 Photonen zur Fixierung eines  $\text{CO}_2$ -Moleküls benötigt (brutto,  $Y_{\text{Ph,CO}_2}$ ). Zum Aufbau der Zelle wird jedoch weiteres ATP benötigt, welches aus der Veratmung der gebildeten Glucose resultiert. Die Anzahl steigt so auf ca. 20 Photonen pro in der Biomasse gebundenem C-Atom (sogenannte Netto-Photosyntheserate). Weiterhin variiert sie abhängig der makromolekularen Zusammensetzung der Mikroalgenzelle, da beispielsweise Lipide einen höheren spezifischen Energiegehalt besitzen. Für protein- oder lipidreiche Zellen kann der Photonenbedarf auf 28-29 ansteigen. (Masojídek et al. 2021; BOLTON und HALL 1991; Posten 2013)

Entsprechend ist das photoautotrophe Wachstum von Mikroalgen im Vergleich zu heterotrophen Mikroorganismen durch das Substrat „Licht“ abzugrenzen. Photonen ersetzen organische Energiequellen, welche als Motor des heterotrophen Stoffwechsels dienen, die Menge an pro Zelle verfügbaren Lichts determiniert bei ansonsten unlimitiertem Wachstum dessen Geschwindigkeit. Zur Beschreibung der Lichtabhängigkeit des Mikroalgen-Stoffwechsels hat sich die sogenannte Photosyntheserate-Lichtintensität-Kurve (kurz P-I-Kurve<sup>1</sup>) etabliert. Hierbei wird die Abhängigkeit der Photosyntheserate vom eingestrahlt Licht beschrieben. Dabei ist die pro Biomasse absorbierte Anzahl an Photonen (sog. Lichtverfügbarkeit) entscheidend, wobei typischerweise drei Bereiche der Kurve identifiziert werden: (1) der lineare Anfangsbereich, (2) der konstante Sättigungsbereich und (3) dem Bereich der Photoinhibierung. Unter Lichtlimitierung (1) hängt die Photosyntheserate linear vom Licht ab, bis die enzymatischen Reaktionen der Dunkelreaktion zum Engpass werden. Im lichtgesättigten Bereich (2) ist die maximale Photosyntheserate erreicht, ab einem Schwellenwert der eingestrahlt Lichtmenge tritt sogar eine Reduktion der Rate aufgrund der sogenannten Photoinhibierung (3) auf. (Masojídek et al. 2021; Richmond und Hu 2013) Wird statt der Photosyntheserate die spezifische Wachstumsrate  $\mu$  aufgetragen, ergibt sich quantitativ ein analoger Kurvenverlauf. Die Übersetzung zwischen beiden Kurven erfolgt über sogenannte kinetische Modelle. (Schediwiy et al. 2019)

Mikroalgen werden in zumeist von außen beleuchteten Photobioreaktoren kultiviert. Das auf die Reaktoroberfläche auftreffende Licht dringt zwar in die Kultursuspension ein, wird allerdings entlang der Reaktordicke durch die gegenseitige Abschattung der Zellen stetig abgeschwächt. Je nach Biomassekonzentration können dadurch Dunkelzonen im Reaktor entstehen, in welchen die Zellen nicht mit Licht versorgt werden. Dieser Lichtpfad ist bei der Simulation des Mikroalgenwachstums zu berücksichtigen, da er zu unterschiedlichen Wachstumsraten entlang der

---

<sup>1</sup> Die einschlägige Literatur definiert P als Abkürzung für die Photosyntheserate. Mit Ausnahme der Nennung der P-I-Kurve an dieser Stelle ist P im gesamten Text der vorliegenden Arbeit allerdings als Abkürzung für Phosphor festgelegt.

Reaktordicke führt (vgl. Kapitel 8.5). Während einer kontinuierlichen Kultivierung im sogenannten Chemostaten wird einem Photobioreaktor permanent frisches, zellfreies Medium mit einem konstanten Volumenstrom ( $F_{\text{Ein}}$ ) zu- und ein gleiches Volumen an zellhaltigem Reaktorinhalt ( $F_{\text{Aus}}$ ) abgeführt (Abbildung 1-4), sodass ein konstantes Kulturvolumen im Photobioreaktor  $V_{\text{PBR}}$  gewährleistet ist. Der Vorteil gegenüber Satzkultivierungen liegt in der ständigen Zufuhr wachstumslimitierender, im Medium gelöster Komponenten. Zudem werden hemmende Stoffwechselprodukte permanent entfernt, wodurch Mikroalgenwachstum und Zellteilung über einen langen Zeitraum hinweg aufrechterhalten werden.

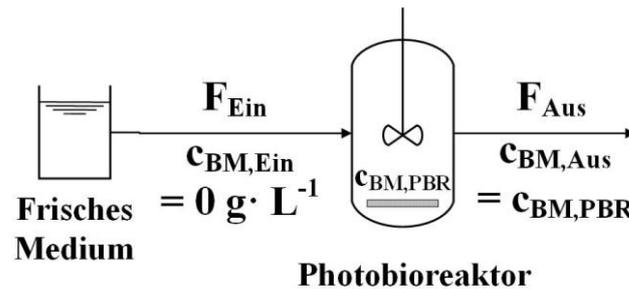


Abbildung 1-4: Ein- und austretende Stoffströme während einer kontinuierlichen Kultivierung in einem Photobioreaktor im stationären Gleichgewicht. Quelle: eigene Darstellung.

Die sogenannte Durchflussrate wird dabei als Maß des pro Zeiteinheit ausgetauschten Reaktorvolumens definiert:

$$D = \frac{F_{\text{Ein}}}{V_{\text{PBR}}} \quad (1.1)$$

Eine Massenbilanz der Biomasse im Photobioreaktor im stationären Gleichgewicht ohne Akkumulation bzw. Nettozunahme von Biomasse (Differenz der durch Teilung neu gebildeten und der im Reaktorausfluss ausgetragenen Biomasse) kann wie folgt aufgestellt werden:

$$F_{\text{Ein}} \cdot c_{\text{BM,Ein}} - F_{\text{Aus}} \cdot c_{\text{BM,Aus}} + \mu \cdot c_{\text{BM,PBR}} \cdot V_{\text{PBR}} = \text{Biomasse Akkumulation} = 0 \quad (1.2)$$

Die Lösung von Gleichung (1.2) liefert folgenden Zusammenhang zwischen Verdünnungsrate  $D$  und spezifischer Wachstumsrate  $\mu$  während einer kontinuierlichen Kultivierung:

$$\mu = D \quad (1.3)$$

Übersteigt die Durchflussrate die speziesabhängige maximale spezifische Wachstumsrate  $\mu_{\text{max}}$ , so kommt es zum Auswaschen der Mikroalgenzellen aus dem Reaktor, da mehr Zellen ausgetragen, als durch Proliferation neu gebildet werden können. (Posten 2018)

Wie erwähnt stellt Substrat „Licht“ bei photoautotrophen Kultivierungen eine Besonderheit da, da dieses nicht durch das Kulturmedium bereitgestellt wird. Steigt die Verfügbarkeit von im Medium gelösten Komponenten mit zunehmender Durchflussrate  $D$  an, so bleibt die in den Photobioreaktor eintretende eintretende Photonenzahl (determiniert durch die auf der Reaktoroberfläche auftreffenden Lichtintensität  $I_0$ ) – und damit der Energieeintrag für die Zellen –

konstant. Die Simulation eines vereinfachten Modells eines einseitig beleuchteten, kontinuierlich betriebenen Plattenreaktors, welches die Abhängigkeiten von Biomassekonzentration, Lichtintensität ( $I_0$ ) und Durchflussrate ( $D$ ) berücksichtigt, ist in Abbildung 1-5 dargestellt. Das Modell gibt das makroskopische Verhalten des Reaktors qualitativ wieder, wobei als Limitierungen für das Mikroalgenwachstum lediglich die Faktoren Licht und Stickstoff berücksichtigt sind. Die der Simulation zugrunde liegenden Formeln und Beziehungen sind im Anhang in Kapitel 8.6.3 dargestellt.

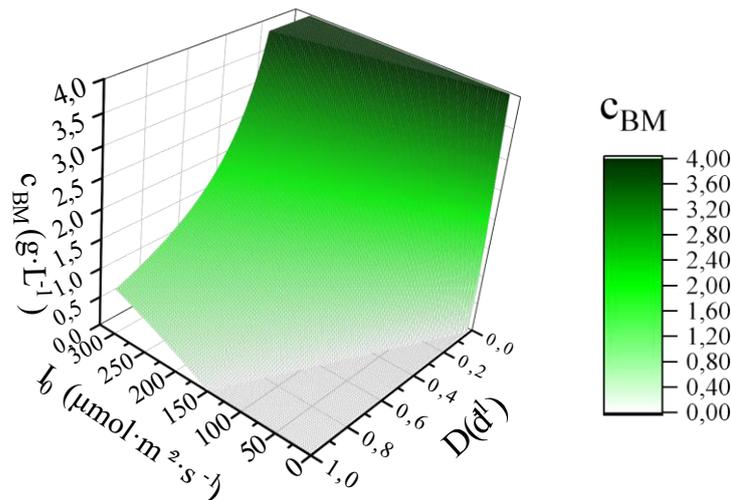


Abbildung 1-5: Simulation einer kontinuierlichen Mikroalgen Kultivierung in einem Flachplatten Photobioreaktor mit einseitiger Beleuchtung. Die erzielbare Biomassekonzentration  $c_{BM}$  hängt von der angewandten Verdünnungsrate  $D$  sowie der eingestrahlten Lichtintensität  $I_0$  ab.

Die maximal erreichbare Biomassekonzentration wird in der Modellierung durch die Nährstoffkonzentration (Stickstoff) im Medium auf  $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  begrenzt und wird lediglich bei hohen Lichtintensitäten und geringen Durchflussraten erreicht. Die Simulation zeigt den Einfluss des Substrates Licht deutlich, da eine Erhöhung der Verdünnungsrate bei konstantem  $I_0$  mit einer Abnahme der Biomassekonzentration einhergeht. Wird die Verdünnungsrate erhöht, werden schlagartig mehr Zellen aus dem Reaktor ausgetragen als durch das Wachstum entstehen. Die damit verbundene erhöhte Verfügbarkeit an Nährstoffen und Licht pro Zelle führt zu einer ansteigenden spezifischen Wachstumsrate, bis das stationäre Gleichgewicht  $\mu = D$  wieder erreicht ist. Da die für das Wachstum zur Verfügung gestellte Energie (Photonen) unabhängig von  $D$  konstant bleibt, der Bedarf pro Zelle bei hohen Verdünnungsraten aber ansteigt, muss die Zellzahl als Konsequenz sinken. Würde die Lichtintensität bei einer definierten Verdünnungsrate erhöht, könnten höhere Biomassekonzentrationen erzielt werden – unter der Voraussetzung, dass Licht und nicht Nährstoffe das Wachstum an diesem Punkt limitieren.

### 1.3.1.5 Nährstoffaufnahme von Mikroalgen

Neben Licht als Energiequelle benötigt eine Mikroalgenzelle für ihr Wachstum eine Vielzahl an Mikro- (z.B. Eisen oder Selen) und Makronährstoffen (wie Stickstoff, Phosphor oder Schwefel), welche bei phototrophen Kultivierungen durch das Kulturmedium zur Verfügung gestellt werden müssen. Für eine Anwendung von Mikroalgen in der Abwasseraufbereitung (Abschnitt 1.3.2) spielen die Verfügbarkeit und Aufnahme von Stickstoff und Phosphor eine zentrale Rolle, weshalb der Fokus des vorliegenden Kapitels auf diese beiden Makronährstoffe gesetzt ist. Eine detailreiche Beschreibung vieler für das Mikroalgenwachstum relevanten Nährstoffe geben Borowitzka et al. 2016 und Procházková et al. 2014.

In natürlichen Habitaten reguliert zumeist die Verfügbarkeit von Stickstoff als limitierendes Element das Wachstum von Mikroalgen. Stickstoff (N) spielt eine zentrale Rolle im Primärmetabolismus einer Mikroalgenzelle und damit in der Synthese von Aminosäuren (und folglich Proteinen), Nukleinsäuren und Pigmenten (Alam und Wang 2019). Für *Chlorella* wird in der Literatur ein intrazellulärer Stickstoffgehalt zwischen 5 und 10 % angegeben (Beuckels et al. 2015). Allerdings ist Stickstoff in seiner anorganischen Form nicht in Algenzellen speicherbar, die Assimilation von N setzt den Einbau in ein Kohlehydrat Skelett voraus, weshalb Stickstoff- und Kohlenstoffmetabolismus eng miteinander verknüpft sind. (Franks et al. 2022) Stickstoff kann in der Zelle also nur aktiv eingebaut, nicht aber als Granula oder Korn gespeichert werden.

In seiner anorganischen Form kann Stickstoff von Mikroalgen als Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) oder Stickstoffoxid ( $\text{NO}_x$ ) aufgenommen und metabolisiert werden (Chen und Wang 2020), wobei  $\text{NH}_4^+$  die bevorzugte Stickstoffquelle darstellt (Alam und Wang 2019), da es direkt verstoffwechselt werden kann. Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) wird nach dessen Aufnahme in die Zelle durch die sogenannte Nitratreduktase im Zytosol zu  $\text{NO}_2^-$  reduziert, wobei ein nicht unerheblicher energetischer Aufwand von 1,81 mol Photonen pro mol  $\text{NO}_3^-$  von der Mikroalgenzelle eingesetzt werden muss (Borowitzka et al. 2016). Nach der Aufnahme von  $\text{NO}_2^-$  in den Chloroplasten wird dieses weiter zu  $\text{NH}_4^+$  reduziert. (Procházková et al. 2014) Im Chloroplasten findet dann im sogenannten GS/GOGAT Zyklus (GS: Glutamin-Synthetase, GOGAT: Glutamin-Oxoglutarat-Amino-Transferase) die Fixierung von  $\text{NH}_4^+$  in einem aus der Photosynthese bzw. dem Calvin-Benson-Zyklus stammenden Kohlenstoffgerüste statt. (Borowitzka et al. 2016)

Abhängig von den umgebenden Bedingungen, welchen eine Algenzelle ausgesetzt ist, werden deren Transkriptom und Proteom angepasst (Borowitzka et al. 2016). Bei einer Stickstofflimitierung wird der Kohlenstofffluss der Photosynthese in Richtung der Synthese von Energiespeichern geleitet. Zu diesen zählen die Speichermoleküle Stärke und Lipide (hauptsächlich Triacylglyceride (TAG), siehe Abbildung 1-6 b-d), welche auf bis zu 70 % des Trockengewichtes einer Mikroalgenzelle ansteigen können. (Procházková et al. 2014; Breuer et al. 2014)

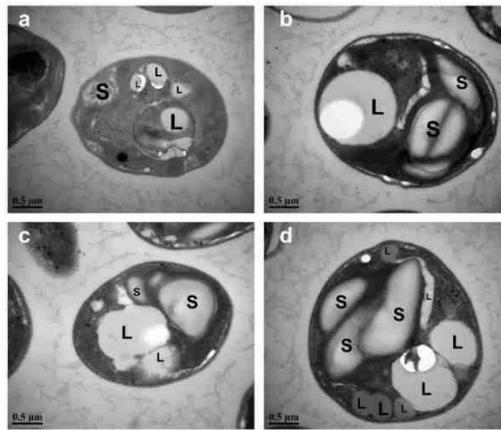


Abbildung 1-6: Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer *C. vulgaris* Zelle unter Stickstofflimitierung. (a) Kontrolle, (b) Limitierung für 3 Tage, (c) Limitierung für 6 Tage und (d) Limitierung für 9 Tage; im Bild: L: Lipidtröpfchen, S: Stärkekorn. Quelle: Liu et al. 2022.

Die Synthese von Stärke und Lipiden hat dabei gemeinsame Vorstufen, wobei Stärke zumeist als Kurzzeitenergiespeicher, Lipide hingegen als Langzeitenergiespeicher fungiert. Die Art und Menge der gebildeten Kohlenstoffspeicher ist dabei speziesabhängig. (León-Saiki et al. 2017; Li et al. 2016; Procházková et al. 2014) Für den in der vorliegenden Arbeit eingesetzten *Chlorella vulgaris* Stamm wurde die zeitgleiche Bildung beider Speicher bei Stickstofflimitierung nachgewiesen (Safi et al. 2014; Liu et al. 2022).

Durch die direkte stöchiometrische Kopplung von Stickstoffaufnahme (und damit dessen Verfügbarkeit) und Wachstumsrate ist bei einer Stickstofflimitierung und einer damit einhergehenden geringeren Aufnahme des Nährstoffs auch die Neubildung von Biomasse reduziert. (Li et al. 2016; Franks et al. 2022). Auf Ebene der Makromoleküle führt dies zu einer Reihe von Anpassungen wie der Reduktion von photosynthetisch aktiven Pigmenten und einer damit einhergehenden verringerten Lichtabsorption. Der zelluläre Energiebedarf ist aufgrund des langsameren Wachstums geringer, weshalb bei gleichbleibender Lichtnutzungseffizienz lediglich die Expression des Photosyntheseapparates reduziert wird. (Benvenuti et al. 2015). Eine andauernde Stickstoffunterversorgung kann allerdings zu einer Schädigung des Chloroplasten führen (Li et al. 2016). Bei einem anhaltend starken Mangel an Stickstoff sind zudem die Proteine des Photosyntheseapparates, wie beispielsweise die des Photosystems II (zuständig für den linearen Elektronentransport), aufgrund ihrer hohen Umsatzrate von einer Degradierung betroffen (Benvenuti et al. 2015; Soto-Ramírez et al. 2021; Janssen et al. 2018). Die Synthese sekundärer Carotinoide ist eine weitere Folge eines Stickstoffmangels in manchen Mikroalgenarten wie beispielsweise *Haemtococcus pluvialis*, welche kommerziell zur Produktion von Nahrungsergänzungsmitteln wie Astaxanthin ausgenutzt wird (Procházková et al. 2014).

Neben Stickstoff besteht eine Mikroalgenzelle aus einer Vielzahl von Elementen, wobei die Elemente Kohlenstoff (C), Wasserstoff (H), Sauerstoff (O), Stickstoff sowie Phosphor (P) den größten Anteil an der Biomasse ausmachen. Eine in diesem Zusammenhang genannte virtuelle Summenformel einer Mikroalgenzelle wurde von Stumm und Morgan 1996 zu  $C_{106}H_{263}O_{110}N_{16}P$  definiert. Diese deckt sich mit dem sogenannten Redfield Verhältnis der

Elemente C:N:P von 106:16:1 in Phytoplankton, welches die Zusammensetzung von natürlichem Seewasser widerspiegelt (Geider und La Roche 2002). Dieses Verhältnis wird oftmals bei der Auswahl geeigneter Kulturmedien für Mikroalgen herangezogen, um die Nährstoffe in adäquater Menge sowie in bioverfügbarer Form für ein unlimitiertes Wachstum bereit zu stellen. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Aufnahmekapazität von Stickstoff und Phosphor gleichermaßen von der umgebenden Konzentration beider Nährstoffe abhängt (Beuckels et al. 2015). So kann bei einem N:P Verhältnis eines Mediums von  $> 16:1$  aufgrund eines Phosphordefizits oftmals keine vollständige Stickstoffaufnahme durch die Mikroalgenzellen erfolgen. Andersherum ist bei N:P von  $< 16:1$  eine vollständige Phosphoraufnahme nur dann möglich, wenn dieser in der Zelle gespeichert wird. (Solovchenko et al. 2016; Beuckels et al. 2015)

Phosphor wird von Mikroalgenzellen als Phosphat ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) aufgenommen, wobei dessen aktiver Transport in die Zelle sehr energieaufwändig ist (Procházková et al. 2014), da die negative Ladung einen diffusiven Transport verhindert (Solovchenko et al. 2016). Eukaryotische Algen wie *Chlorella vulgaris* exprimieren zumeist mehrere Phosphattransporter auf ihrer Zelloberfläche, deren Form und Zahl die die Kinetik der Phosphataufnahme bestimmt, wobei diese in der Regel als Michaelis-Menten Kinetik beschrieben wird. (Borowitzka et al. 2016). Der intrazelluläre Phosphorgehalt von *Chlorella* wird in der Literatur abhängig der umgebenden Phosphorkonzentrationen zwischen 0,5 und 1,3 % angegeben (Beuckels et al. 2015). In Zellen dient Phosphor als „Energiewährung“ (ATP und GTP), um verschiedenste biochemische Reaktionen zu realisieren. Zudem wird der Nährstoff zur Modifikation von Proteinfunktionen genutzt und ist ein wichtiger Baustein von Membranlipiden (Phospholipide), phosphorylierten Zuckern und Nukleinsäuren. Letztere stellen dabei die Hauptsenke für Phosphor in der Zelle dar. (Borowitzka et al. 2016)

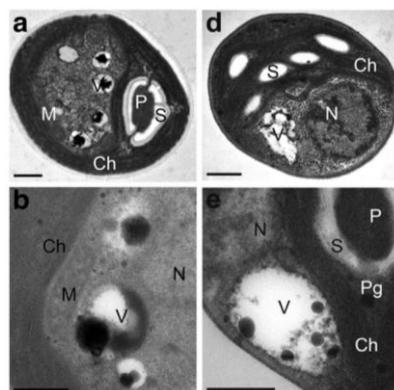


Abbildung 1-7: Mikroskopische Aufnahmen (Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)) von *C. vulgaris* mit Phosphatakkumulation. im Bild: P: Polyphosphat-Granula, Ch: Chloroplast, M: Mitochondrium, N: Nukleus, V: Vakuole; Quelle: Solovchenko et al. 2019b.

In einigen Mikroalgenpezies wurde die Fähigkeit zur Speicherung von für das Wachstum überschüssigem anorganischen Phosphor in sogenannten Polyphosphat-Granula nachgewiesen (siehe Abbildung 1-7). Dieser in der einschlägigen Literatur auch als „luxury uptake“ bezeichnete Vorgang wird durch einen Phosphorüberschuss im umgebenden Medium induziert und kann den intrazellulären Phosphorgehalt auf bis zu 4-6 % steigern. Die Granula sind langkettige

Polymere aus Orthophosphat, welche über hochenergetische, ATP-ähnliche Bindungen miteinander verknüpft sind. Neben der Speicherung von Phosphor können sie weitere biologische Funktionen in Zellen übernehmen, darunter als Energiespeicher, Regulation der Genexpression, oder als Chelator für Schwermetalle. Die Fähigkeit einiger Mikroalgenpezies – darunter auch *Chlorella* – zur Speicherung von Polyphosphat hat für eine Anwendung und Valorisierung von Algenbiomasse viele Vorteile: Im Abwasserbereich können so Abwässer unterschiedlichster Nährstoffbelastungen eingesetzt werden, auch Schwankungen in der Zusammensetzung sind dadurch ausgleichbar. Hinsichtlich eines Einsatzes von Mikroalgen als Düngemittel ist P-reiche Biomasse eine nachhaltige Alternative zur effizienten Nährstoffsupplementierung von landwirtschaftlichen Flächen. (Sforza et al. 2018; Powell et al. 2009; Solovchenko et al. 2019b)

### 1.3.1.6 Metabolismus bei Abwesenheit von Licht

Fällt der Begriff „Photosynthese“, so ist dieser unweigerlich mit dem Wort „Licht“ assoziiert – da Photonen die benötigte Energie für die Reaktionen liefern. Die zellulären Vorgänge bei Licht bzw. variierenden Lichtverfügbarkeiten wurden bis heute bis ins Detail untersucht und verschiedene Modelle zur mathematischen Beschreibung der Photosynthese entworfen (Schediwy et al. 2019; De-Luca et al. 2018). Der Metabolismus einer Mikroalgenzelle bei Abwesenheit von Licht ist nicht direkt mit dem photosynthetischen Apparat, sondern mit den Mitochondrien bzw. der mitochondrialen Atmung verknüpft. Die Stoffwechselprozesse finden auch bei Anwesenheit von Licht statt und werden zudem indirekt durch die Lichtintensität beeinflusst. (Masojídek et al. 2021) Bisher sind die auch als „Dunkelmetabolismus“ bezeichneten Abläufe allerdings wenig untersucht. Die Stoffwechselrate bei Dunkelheit macht speziesabhängig 10-15 % der Brutto-Photosyntheserate aus und reduziert die Netto-Biomasseproduktion damit wesentlich (Beardall et al. 1994).

Die am häufigsten auftretende Problemstellung in Zusammenhang mit einer Untersuchung des Metabolismus im Dunkeln ist der Verlust an Biomasse über Nacht. Zumeist wird eine unerwünschte Reduktion der Biomasse um bis zu 22 % beobachtet, welche mit der Wachstumsphase der Zellen sowie der Lichtverfügbarkeit während des Tages in Verbindung gebracht wird. (Ogbonna und Tanaka 1996; Edmundson und Huesemann 2015; León-Saiki et al. 2017; Doucha und Lívanský 1995; Torzillo et al. 1991; Grobbelaar und Soeder 1985). Oftmals wird die höchste Biomasseabnahme in der exponentiellen Wachstumsphase einer Satzkultivierung postuliert (Ogbonna und Tanaka 1996; Edmundson und Huesemann 2015), wobei die sinkende Lichtverfügbarkeit pro Zelle mit zunehmender Kultivierungsdauer nicht in der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt wird. Zwischen Lichtintensität und der Menge an synthetisierten intrazellulären Kohlenhydraten, hauptsächlich Stärke, besteht eine positive Korrelation (Torzillo et al. 1991). Die Stärke dient den Mikroalgen dabei als wichtiger Kurzzeitenergiespeicher (León-Saiki et al. 2017). Folglich hängt die Reduktion der Biomasse von der Menge an Stärke ab, die eine Mikroalgenzelle während des Tages akkumuliert und während der Dunkelheit verbraucht (Lu et al. 2005; Edmundson und Huesemann 2015; Ogbonna und Tanaka 1996). Cha et al. wiesen eine Abnahme des intrazellulären Lipidgehaltes während einer sechstägigen Inkubation von *Chlorella* im Dunkeln nach. Eine Analyse der Fettsäuren zeigte zunächst eine Zunahme der gesättigten Fettsäuren nach kurzer Dunkelinkubation von drei Tagen, gefolgt von deren Abnahme. Die Synthese gesättigter Fettsäuren dient bei Lichtüberschuss als Senke für die während der Photosynthese entstehenden Energieträger ATP und NADPH<sub>2</sub> (Sforza et al. 2012; Amini

Khoeyi et al. 2012; Zhukova 2007). Die Ergebnisse zeigen, dass *Chlorella* gesättigte Fettsäuren als Langzeitenergiespeicher auch bei Abwesenheit von Licht bildet und anschließend zur Energiebereitstellung metabolisiert.

Auf der Genomebene entdeckten Mundt et al. eine Veränderung der Gen-Transkripte in Richtung heterotrophe Energieversorgung (Stärke- und Triacylglyceridstoffwechsel), wenn die Photosynthese nicht effizient ist oder gar nicht stattfindet (Mundt et al. 2019). Darüber hinaus werden intrazelluläre Kohlenstoff- und Stickstoffflüsse bei geringen Lichtintensitäten ( $2 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) von der Produktion von Energiespeicherkomponenten auf die Protein- und Pigmentsynthese umgelenkt (Mock und Kroon 2002). Dies unterstreicht, dass Mikroalgenzelle auch bei Abwesenheit von Licht metabolische Aktivität zeigen.

Zu den Stoffwechselaktivitäten während der Dunkelheit gehören demnach sowohl die Veratmung von Stärke sowie Speicherlipiden als auch der Aufbau von zellulären Makromolekülen wie Proteinen sowie Zellwachstum bzw. -teilung (Ogbonna und Tanaka 1996; Cha et al. 2021). Neben der Lichtverfügbarkeit hat zudem die Temperatur vor und während der Dunkelphasen einen Einfluss auf den Metabolismus bei Abwesenheit von Licht (Grobelaar und Soeder 1985; Torzillo et al. 1991).

Janssen et al. wiesen außerdem eine nächtliche Aufnahme von Stickstoff in stickstofflimitierten *Nannochloropsis*-Kulturen. Dabei wurde der Nährstoff zu Beginn einer achtstündigen Dunkelphase zugegeben und zum Aufbau von Proteinen, Pigmenten und neuer Biomasse genutzt. Studien dieser Art verfolgen zumeist die Steigerung der Lipidproduktion, um die gewonnene Biomasse zur Biokraftstoffproduktion einzusetzen. Eine genauere Untersuchung der Mechanismen der Nährstoffaufnahme bei Dunkelheit steht also noch aus.

## 1.3.2 Mikroalgen in der Abwasseraufbereitung

### 1.3.2.1 Konventionelle Abwasseraufbereitung – Überblick und Herausforderungen

Die menschliche Existenz ist direkt an das Vorhandensein von (Trink)Wasser geknüpft. Wo Menschen Zivilisationen etablieren, fällt allerdings auch Abwasser an. Bereits vor dem industriellen Zeitalter wurden in China und im römischen Reich Kanalsysteme entwickelt, um Abwässer aus den Städten zu leiten und damit Krankheiten einzudämmen. Mit Beginn der industriellen Revolution im 19. Jahrhundert wurde das Abwasser auch aufgrund der toxischen Rückstände der Industrieprozesse ein zunehmendes Problem, weshalb die erste kommunale Abwasseranlage 1876 in England entstand. (Mohsenpour et al. 2021) In Deutschland werden Abwässer heute in rund 10.000 Anlagen aufbereitet, über 97 % der Bevölkerung an die zentrale öffentliche Kanalisation angeschlossen (Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und nukleare Sicherheit 2023b). Abwässer werden hauptsächlich in drei Gruppen eingeteilt: kommunale, landwirtschaftliche und industrielle Abwässer mit unterschiedlichen Gehalten an Kohlenstoff (C), Stickstoff (N) und Phosphor (P), welche vor dem Einleiten in natürliche Gewässer zum Schutz vor Eutrophierung entfernt werden müssen. Vor allem landwirtschaftliche Abwässer weisen hohe N- und P-Gehalte auf ( $0,08 - 491 \text{ mmol}_N\cdot\text{L}^{-1}$  und  $0 - 19,5 \text{ mmol}_P\cdot\text{L}^{-1}$ , Monfret und Unc 2017), die in konventionellen Aufarbeitungsanlagen oft nicht vollständig entfernt werden können.

## Überblick konventioneller Abwasseraufbereitungsanlagen

Die heutige konventionelle Abwasseraufbereitung in den Kläranlagen Deutschlands besteht aus einer Abfolge an physikalischen oder mechanischen, chemischen und biologischen Methoden. Im Wesentlichen ist der Prozess durch den Abbau organischer Verbindungen mittels eines Konsortiums von Bakterien charakterisiert, welche diese in ein stabiles Endprodukt unter der Bildung von CO<sub>2</sub> und CH<sub>4</sub> abbauen. (Shah 2023) Zumeist wird in der ersten Reinigungsstufe eine mechanische Entfernung von festen Schwimm- und Schwebstoffen erreicht. Anaerobe und aerobe mikrobiologische Abbauvorgänge (Belebtschlammverfahren) bilden die zweite Reinigungsstufe zur Elimination von Kohlenstoffverbindungen und organisch gebundenem Stickstoff (bakterielle Nitrifikation und Denitrifikation). Zu den chemischen Verfahren der dritten Reinigungsstufe zählen die abiotische Oxidation oder die Fällung von Phosphor. Abhängig von der Art des Abwassers beziehungsweise dessen Verunreinigung folgt eine vierte Stufe zur Entkeimung oder Entfernung von Spurenstoffen. (Shah 2023; Ación Fernández et al. 2018)

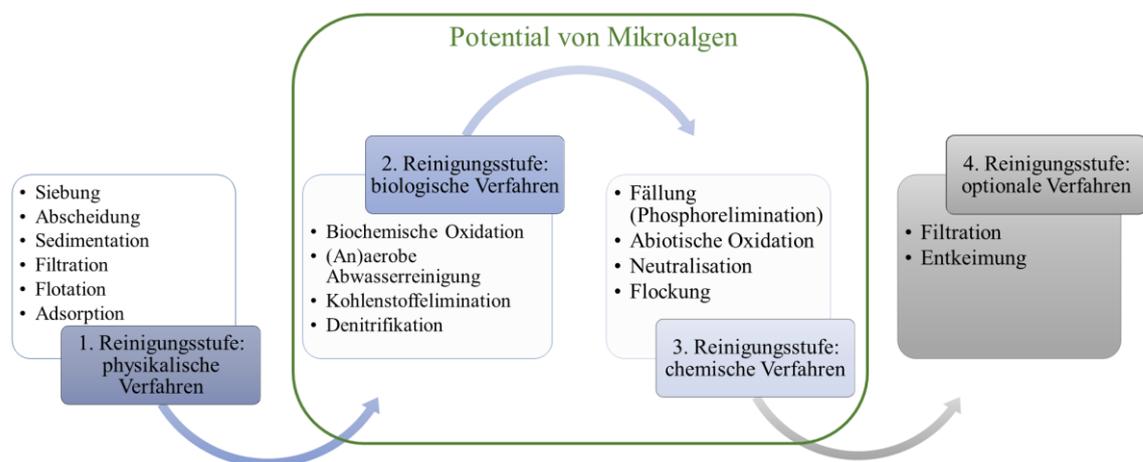


Abbildung 1-8: Übersicht der einzelnen Reinigungsstufen und Verfahren der konventionellen Abwasseraufbereitung in Kläranlagen in Deutschland. Ein potenzieller Einsatz von Mikroalgen zur Aufbereitung ist in der zweiten und dritten Reinigungsstufe denkbar (grüne Markierung). Quelle: eigene Darstellung nach Shah 2023 und Ación Fernández et al. 2018.

## Herausforderungen der konventionellen Abwasserbehandlung

Ein Hauptproblem der konventionellen Abwasseraufbereitung ist deren hoher Energieverbrauch, welcher zwischen 25-40 % der gesamten Betriebskosten einer Anlage verursacht (Shah 2023). Dabei liegt der Energiebedarf konventioneller Anlagen bei bis zu 2-4 % des nationalen Energieverbrauchs (Bhatia et al. 2021; Li et al. 2019), wobei in Deutschland ~67 % davon auf die biologische Reinigung und Nachklärung entfallen (Umweltbundesamt: Energieeffizienz kommunale Kläranlagen 2011). Vor allem ist die für das Wachstum sowie den Abbau der organischen Bestandteile aerober Mikroorganismen notwendige Belüftung der Belebungsbecken energieintensiv. Überdies hinaus haben durch konventionelle Anlagen geklärte Abwässer einen hohen Restenergiegehalt von 7,6-16,8 kJL<sup>-1</sup>, welcher bei einer Einleitung in natürliche Gewässer ungenutzt bleibt (Nagarajan et al. 2020). Die Emission großer Mengen an Treibhaus-

gasen (Kohlenstoffdioxid, Methan sowie Distickstoffmonoxid) ist ein weiteres schwerwiegendes Problem der konventionellen Abwasseraufbereitung (Li et al. 2019; Mannina et al. 2016). Es wird geschätzt, dass die aktuell durch den Sektor Abwasser entstandenen Treibhausgasemissionen 0,5 % der Gesamtemissionen des Landes Österreich betragen (Tauber et al. 2023). Diese entstehen im Zuge biologischer Prozesse (mikrobielle Atmung, Nitrifizierung/Denitrifizierung, anaerobe Faulung) sowie der für den Anlagenbetrieb benötigten Energie und Ressourcen (Mannina et al. 2016). Hierzu tragen auch die hohen Mengen an Klärschlamm bei, da diese oftmals nur durch anaerobe Faulung entsorgt werden können (Nagarajan et al. 2020; Mohsenpour et al. 2021). Der hohe Einsatz von Antibiotika beispielsweise in der Tierzucht bedingt eine entsprechend hohe Belastung (landwirtschaftlicher) Abwässer, welche in konventionellen Anlagen nicht vollständig gereinigt werden können. Neben hohen Kosten für eine vollständige Entfernung entsteht eine weitere, schwerwiegende Problematik: der entstehende Klärschlamm ist aufgrund der hohen Konzentration an Antibiotika-assoziierten Stoffen ein wesentlicher Gefahrenherd für die Entwicklung multiresistenter Keime. (Amaro et al. 2023) Im Zuge konventioneller Methoden der Abwasseraufbereitung werden die Nährstoffe Stickstoff und Phosphor gasförmig als  $N_2$  bzw. chemisch gebunden durch die Fällung (Phosphor) aus dem Abwasser entfernt und sind somit für eine direkte weitere Nutzung nicht zugänglich. Die Rückgewinnung von Stickstoff durch das Haber-Bosch Verfahren ist energieintensiv und macht für die Düngemittelherstellung Schätzungen zufolge 1-2 % des globalen Energiebedarfs aus (Ye et al. 2021). Phosphor wird durch einen Abbau von Phosphor-haltigen Mineralien gewonnen (Solovchenko et al. 2016), eine endliche Ressource also, welche Schätzungen zufolge bis zum Jahre 2070 versiegen könnte (Nagarajan et al. 2020). Die Verfügbarkeit von N und P als essenzielle Makronährstoffe limitiert das Wachstum von Pflanzen, weshalb beide Nährstoffe Hauptkomponenten in Pflanzendüngern sind und damit eine zentrale Rolle in der Versorgung der Weltbevölkerung spielen.

Eine Reihe von physikalisch-chemischen Methoden (Oxidation, Aktivkohle, Membranfiltration, UV-Strahlung, Chlorierung oder Ozonisierung) wurden als Verbesserung der Abwasseraufbereitung identifiziert, allerdings limitieren die Entstehung toxischer Nebenprodukte sowie hohe Einsatzkosten deren Einsatz. Biologische Alternativmethoden werden als umweltfreundlicher eingestuft, hierzu zählt auch der Einsatz von Mikroalgen. Die Flexibilität des Mikroalgen-Stoffwechsels erlaubt die Entfernung verschiedenster Verunreinigungen aus Abwässern und ist im folgenden Abschnitt beschrieben. (Amaro et al. 2023)

### **1.3.2.2 Potential von Mikroalgen in der Abwasseraufbereitung**

Aufgrund der enthaltenen Nährstoffe Stickstoff und Phosphor sowie deren physiologisch vorteilhaftem Verhältnis zwischen 10:1 und 20:1 mol<sub>N</sub>:mol<sub>P</sub> (Monfet und Unc 2017; Li et al. 2019) werden Abwässer unterschiedlichster Herkunft bereits seit den 1950er Jahren als ideales Nährmedium für die Mikroalgenkultivierung genannt (Oswald et al. 1957). Bis heute sind hohe Produktionskosten ein wesentlicher Nachteil der Mikroalgenkultivierung im großen Maßstab, welche vor allem für die Bereitstellung der für das Wachstum benötigten Nährstoffe anfallen (Acién et al. 2012). Der Einsatz von Abwässern als Kulturmedium stellt daher eine vielversprechende und ökonomische Alternative dar (Acién Fernández et al. 2018). Ein damit einhergehender Nutzen ist die gleichzeitig stattfindende, effiziente Aufreinigung des eingesetzten Abwassers mit einer direkten Fixierung der zu entfernenden Nährstoffe in der neu gebildeten

Biomasse. Zudem ist diese Biomasse eine wertvolle Ressource für eine Vielzahl nachhaltiger Anwendungen (Abbildung 1-9) wie beispielsweise der Produktion von Biogas oder Biokraftstoffen, der Herstellung von Pharmazeutika oder als Einsatzstoff in der Lebensmittel- und Futtermittelindustrie (Li et al. 2019). Als biologisches Reinigungsverfahren ist die Integration von Mikroalgenkultivierungssystemen in bestehende Anlagen mit geringem Aufwand möglich (Roostaei und Zhang 2017), bei gleichzeitig geringeren Betriebskosten (Nagarajan et al. 2020).

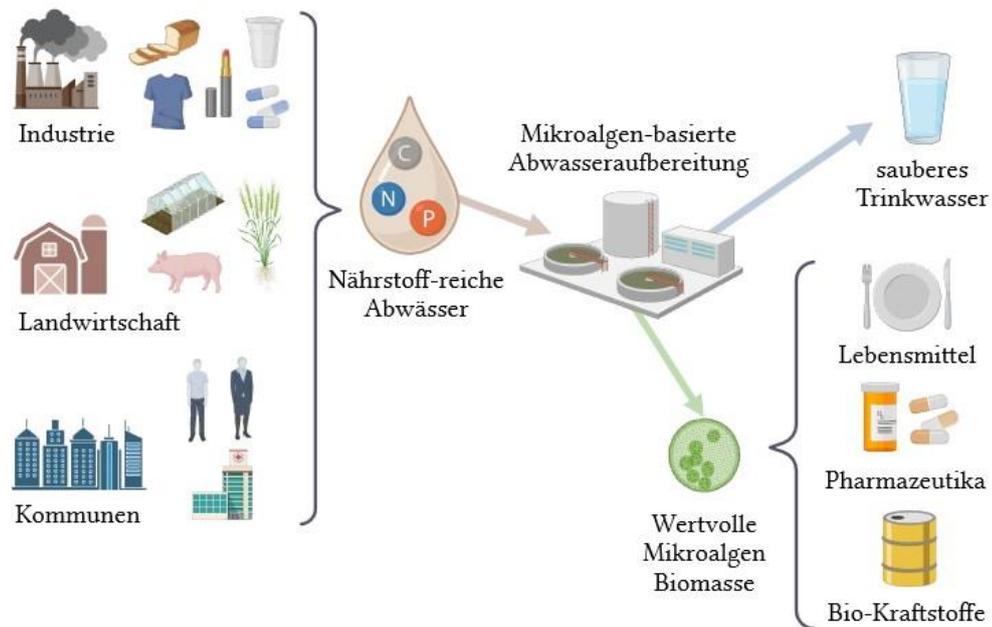


Abbildung 1-9: Bioökonomie Konzept der Abwasseraufbereitung mittels Mikroalgen. Quelle: eigene Darstellung nach Nagarajan et al. 2020, Ru et al. 2020 und Bhatia et al. 2021 mittels BioRender.com.

Gegenüber konventionellen Methoden hat die Abwasseraufbereitung mittels Mikroalgen eine Vielzahl an Vorteilen. Insbesondere der Einbau von Stickstoff und Phosphor in die Algenbiomasse (in Proteinen und Nukleinsäuren) ist im Vergleich zu konventionellen Methoden vorteilhaft (Nagarajan et al. 2020; Shah 2023). Die Nährstoffe sind damit in der Mikroalgenzelle fixiert und gehen somit nicht in die Atmosphäre oder Umwelt verloren, sondern stehen direkt für eine weitere Nutzung zur Verfügung. Eine Vielzahl an Studien konnte bereits eine hoch effektive Aufnahme von Stickstoff verschiedener Quellen (organisch und anorganisch) und Phosphor durch Mikroalgenzellen zeigen (Li et al. 2019; Chai et al. 2021; Abdelfattah et al. 2023). Selbst hohe Ausgangskonzentrationen im Abwasser können auf sehr niedrige Restkonzentrationen im geklärten Wasser ( $< 1 \text{ mg}_N \cdot \text{L}^{-1}$ , unter der Nachweisgrenze für P) reduziert werden (Beuckels et al. 2015; Nagarajan et al. 2020). Die Kohlenstoffquelle einer Mikroalgenzelle bei photoautotrophem Wachstum ist  $\text{CO}_2$ , welches aus der Atmosphäre oder aber aus Industrieprozessen bereitgestellt werden kann. Damit sind Treibhausgasemissionen mikroalgenbasierter Abwasserprozesse im Vergleich zu konventionellen Anlagen wesentlich reduziert. (Chai et al. 2021; Nagarajan et al. 2020) Mikroalgensysteme werden außerdem als Alternative zur Abwasserdesinfektion genannt. (Amaro et al. 2023). Die Algenzellen verändern durch ihre Proliferation die Umweltbedingungen im Abwasser negativ für Pathogene wie fäkalkoliforme Bakterien durch die Veränderung des pHs und der gelösten Sauerstoffkonzentration. Die Kon-

kurrenz um Nährstoffe zwischen Bakterien und Alge sowie die von Mikroalgen sekretieren antimikrobieller Metabolite und Toxine führen zudem zu einem Absterben der Pathogene. Zuletzt führt die Anlagerung von Bakterien an die Mikroalgenzellen gefolgt von deren Sedimentation zur Reduktion pathogener Bakterien. (Chai et al. 2021) Weiterhin kann eine Vielzahl an schwer zu entfernenden Verunreinigungen in den Abwässern (Schwermetalle, pharmazeutische Wirkstoffe wie Antibiotika, Pestizide oder Tenside) von Mikroalgen an der Zelloberfläche absorbiert bzw. in die Biomasse aufgenommen werden (Chai et al. 2021), wodurch ein breites Spektrum an Abwässern aufgearbeitet werden kann. Zudem erfordert die Entfernung der genannten Komponenten keinen Chemikalieneinsatz, wodurch eine Kostenreduktion im Vergleich zu konventionellen Methoden erzielt wird (Li et al. 2019). Auch ein geringerer Energiebedarf Algen-basierter Anlagen durch die Nutzung natürlichen Sonnenlichts als Energiequelle führt zu einer Senkung der Betriebskosten, weiterhin entfällt der im Belebtschlammverfahren obligate, energieintensive Schritt der Sauerstoffbegasung (Acién Fernández et al. 2018).

### 1.3.2.3 Anwendung von Mikroalgensystemen in der Abwasseraufbereitung

Die Zahl an wissenschaftlichen Veröffentlichungen zum Thema Mikroalgen in der Abwasseraufbereitung hat sich in den letzten zehn Jahren nahezu verzehnfacht (Quelle: Scopus<sup>2</sup>), wobei die Forschung zumeist auf Experimente im Labormaßstab mit synthetischen Abwässern limitiert ist. Durch diese Studien entstand ein immenses und wertvolles Wissen über die Mechanismen der Nährstoffaufnahme der Algenzellen im Kontext der Abwasseraufbereitung, welche als Basis für die Etablierung mikroalgenbasierter Aufbereitungsprozesse dienen. Im Zuge internationaler Forschungsprojekte konnten zudem bereits einige Pilot- und Demonstrationsanlagen in Betrieb genommen werden und damit erste Erfolge der mikroalgenbasierten Abwasseraufbereitung erzielen. Im vorliegenden Kapitel sind beispielhaft einige dieser Arbeiten zusammengefasst, um einen anwendungsbezogenen Überblick aktueller Projekte zu geben.

#### Spezies und Kultivierungssysteme in der mikroalgenbasierten Abwasseraufbereitung

Im Bereich der Abwasseraufbereitung werden Mikroalgen entweder als Monokultur, Polykultur (verschiedene Mikroalgen Spezies) oder Konsortium aus Algen und Bakterien eingesetzt (Amaro et al. 2023). Zu den am häufigsten verwendeten Spezies gehören unter anderem *Chlorella*, *Desmodesmus*, *Scenedesmus*, *Dunaliella*, *Chlamydomonas*, *Arthrospira* (früher *Spirulina*), *Euglena*, *Ettlia* (früher *Neochloris*) und *Ankistrodesmus* (Shah 2023; Mohsenpour et al. 2021; Demirer und Uludag-Demirer 2022).

Kultivierungssysteme für Mikroalgen werden generell in offene (Tanks, Teiche und Becken (engl. *Pond* oder *Raceway*), Kaskaden) und geschlossene Photobioreaktoren (Beutel, Säulen, Glasrohre, Flachplatten) eingeteilt (Masojídek et al. 2023). Offene Systeme wie die sogenannten Open Pond („offenes Becken“) - oder Raceway Pond („Laufstrombecken“)-Systeme (Abbildung 1-10) sind als ökonomische Lösung in der großtechnischen Mikroalgenkultivierung etabliert und sind daher für einen Einsatz in der Abwasseraufbereitung besonders geeignet. Pond-Systeme im Außenbereich nutzen Sonnenlicht als Energiequelle. Neben den geringen

---

<sup>2</sup> Stichwortsuche „wastewater“ und „microalgae“ unter [www.scopus.com](http://www.scopus.com); Anzahl Dokumente im Jahr 2013: 371, Anzahl Dokumente im Jahr 2023: 3173, Stand: November 2023.

Installationskosten sind vor allem die niedrigen Betriebskosten ( $10 \text{ €/m}^2$ ) sowie der geringe Energiebedarf ( $2\text{-}10 \text{ W/m}^3$  Kulturmedium) für den Einsatz der Pond-Systeme relevant. (Acién Fernández et al. 2018) Allerdings liegen die erzielbaren Biomassekonzentrationen aufgrund der Reaktortiefe zwischen  $15\text{-}30 \text{ cm}$  und der damit einhergehenden ungünstigen Lichtverteilung lediglich im Bereich von  $0,5\text{-}1,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , wodurch auch die anschließende Aufarbeitung der Biomasse erschwert ist. Eine Reduktion der Reaktortiefe offener Systeme auf  $0,5\text{-}5 \text{ cm}$  wird als Weiterentwicklung der klassischen Pond-Systeme bereits seit Ende 1950 eingesetzt. (Masojídek et al. 2023; González-Camejo et al. 2021) Im Bereich der mikroalgenbasierten Abwasseraufbereitung sind die sogenannten High Rated Algae Ponds (HRAP) etabliert, diese bestehen aus einem ebensolchen Raceway Pond mit reduzierter Reaktortiefe, in welchem die Kulturflüssigkeit über ein Schaufelrad zirkuliert wird. HRAP-Systeme zeichnen sich vor allem durch geringe Investitionskosten und moderate Betriebskosten aus. Zudem erlaubt die geringe Reaktortiefe eine verbesserte Lichtnutzung durch die Mikroalgenzellen, einhergehend mit höheren Biomassekonzentrationen. (Razaviarani et al. 2023)



Abbildung 1-10: Offene Reaktorsysteme (A: Raceway Pond, B: Raceway-Kaskadeneinheiten) im großen Maßstab zur Mikroalgenkultivierung. (A) Raceway Pond System ( $15,500 \text{ m}^2$  Fläche,  $5000 \text{ m}^3$  Volumen) für die mikroalgenbasierte Aufarbeitung eines urbanen Abwassers in Agramón, Spanien. (B) Raceway-Kaskadeneinheiten ( $2,500 \text{ m}^2$  Fläche, je  $100 \text{ m}^3$  Volumen) einer großtechnischen Produktionsanlage von *Nanochloropsis*-Biomasse in Póvoa de Santa Iria in Portugal. Quelle: Masojídek et al. 2023.

### Aktuelle mikroalgenbasierte Pilot- und Demonstrationsprojekte in der Abwasseraufbereitung

Im Bereich der Pilotprojekte mit dem Ziel der Entfernung pharmazeutischer Wirkstoffe aus Abwässern konnten Hom-Díaz et al. ein Toilettenabwasser in einem  $1200 \text{ L}$  Photobioreaktor klären. Der eingesetzte Photobioreaktor wurde dabei auf dem Dach des Biological and Environmental Engineering Department der Universität Autònoma von Barcelona, Spanien installiert. Innerhalb von 8 (September bis Oktober) bzw. 12 Tagen (Oktober bis Dezember) gelang es, das Toilettenabwasser zu klären (Nährstoffreduktion  $> 80 \%$ , Reduktion von Pharmazeutika  $> 48 \%$ ). (Hom-Díaz et al. 2017) Mantovani et al. setzen in einer Machbarkeitsstudie einen  $1200 \text{ L}$  Raceway Reaktor in einer kommunalen Kläranlage in Norditalien ein. Dabei sollte ein Konsortium aus Mikroalgen (*Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Chlamydomonas* sp.) und Bakterien einen Nebenstrom einer Entwässerungsanlage von Toilettenabwasser reinigen. Bei einer HRT von 10 Tagen konnte das System erfolgreich zur Abwasserreinigung eingesetzt werden,

wobei 86 % des enthaltenen Stickstoffs und 71 % des enthaltenen Phosphors aus dem Abwasser entfernt wurden. (Mantovani et al. 2020)

In einer Kläranlage in Almería, Spanien (El Toyo Kläranlage) wurde ein alternatives Abwasseraufbereitungsverfahren mittels Mikroalgen im Laufe eines Jahres untersucht. Dabei wurde in das bestehende System ein HRAP (3000 m<sup>2</sup> Fläche), gefolgt von einem künstlich angelegten Feuchtbiotop (engl. *vertical flow constructed wetland*, Fläche 200 m<sup>2</sup>) integriert (Abbildung 1-11). Beide Systeme (konventionell und mikroalgenbasiert) wurden hinsichtlich der Effizienz der Abwasserbehandlung, der erzeugten Wasserqualität, dem Energiebedarf sowie der anfallenden Menge an Klärschlamm verglichen. Die Algenabtrennung nach dem HRAP erfolgte mittels Flotation, das gewonnene Effluent wurde im Anschluss in das künstliche Biotop zur weiteren Klärung eingeleitet. Pro Tag wurden in der konventionellen Anlage ~4000 m<sup>3</sup> Abwasser aufbereitet, die Kapazität der Wasseraufbereitung des HRAP lag lediglich bei 180-250 m<sup>3</sup> Abwasser pro Tag. Dies entspricht einer HRT zwischen 3,5 und 5 Tagen, welche abhängig der Jahreszeit zur Einhaltung der geforderten Wasserqualität angepasst wurde. Dabei konnten 76,6 % des enthaltenen Stickstoffs sowie 89,8 % des enthaltenen Phosphors aus dem Abwasser entfernt werden. Die Wasserqualität nach dem Passieren des künstlichen Feuchtbiotops lag im Bereich der konventionellen Anlage, wodurch die Machbarkeit der mikroalgenbasierten Wasseraufbereitung demonstriert werden konnte. Der Energiebedarf des mikroalgenbasierten Verfahrens war gegenüber dem konventionellen Verfahren wesentlich reduziert (0,10 kWh·m<sup>-3</sup> Abwasser im Vergleich zu 0,56 kWh·m<sup>-3</sup> Abwasser), das vorgestellte System kann daher als nachhaltiges Alternativverfahren in kleineren Kläranlagen Einsatz finden. (Saúco et al. 2021)



Abbildung 1-11: HRAP (a) und künstlich angelegtes Feuchtbiotop (b) der konventionellen Kläranlage El Toyo in Almería, Spanien (c). Quelle: Saúco et al. 2021.

Das EU-Projekt SABANA (Sustainable Algae Biorefinery for Agriculture and Aquaculture, H2020) verschrub sich dem Ziel eine mikroalgenbasierte Bioraffinerie im industriellen Maßstab zur Produktion von Biostimulanzien, Biopestiziden, Futtermittelzusätzen, Biodüngern und Aquafuttermitteln unter Einsatz von Meerwasser und landwirtschaftlichen Abwässern als Kulturmedium. Zwischen 2017-2020 entstanden hierfür zwei Demonstrationsanlagen zur Mikroalgenkultivierung in Spanien (Mérida: 2 ha und Almería: Raceway Pond Reaktor, 10.500 m<sup>2</sup> Fläche, 5000 m<sup>3</sup> Volumen). (Masojídek et al. 2023)

Im Rahmen des INCOVER (Innovative Eco-Technologies for Resource Recovery from Wastewater) Projektes der europäischen Union (EU) wurden Prozessstrategien zur Aufarbeitung urbaner und industrieller Abwässer entwickelt. Das Ziel des INCOVER Projektes (2016-2019) war die Rückgewinnung von Ressourcen aus Abwässern durch biologische Stoffproduktion. Landwirtschaftliche und urbane Abwässer wurden dabei in drei halb-geschlossenen horizonta-

len Photobioreaktoren (30 m<sup>3</sup> gesamt, siehe Abbildung 1-12) durch ein Konsortium verschiedener Mikroalgen- und Bakterienspezies gereinigt. Dabei wurde das Wachstum von Cyanobakterien durch Anpassung der Prozessstrategie gefördert, welche Polyhydroxybuttersäure (PHB) als Ausgangsstoff für die Bioplastikproduktion akkumulieren. Die Anlage war in der Lage 6,9 m<sup>3</sup> Abwasser pro Tag aufzureinigen und dabei 2 kg PHB-reiche Biomasse zu erzeugen. (Uggetti et al. 2018)

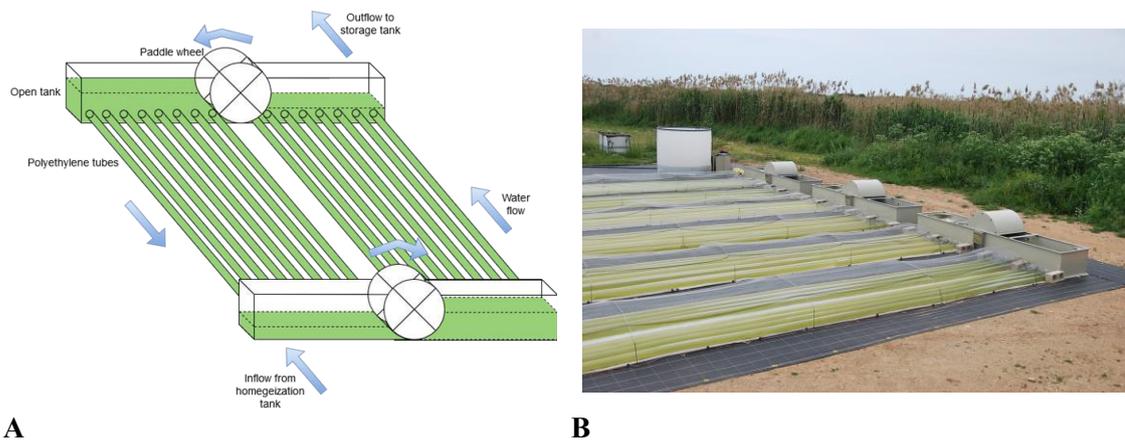


Abbildung 1-12: Pilotanlage des INCOVER-Projektes bestehend aus drei in Reihe geschalteten Photobioreaktoren (B) sowie schematischer Aufbau der einzelnen Photobioreaktoren (A). Jede Reaktoreinheit besteht aus zwei offenen Polypropylen-Tanks (Länge: 5 m, Breite: 2 m, Höhe: 0,6 m, Arbeitsvolumen 1,25 m<sup>3</sup>), welche über 16 dünnwandige Polyethylen-Schläuche (125 mm Durchmesser, 47 m Länge, 11,7 m<sup>3</sup> Arbeitsvolumen) verbunden sind. Die Durchmischung der Reaktoren erfolgt über ein Schaukelrad. Quelle: Uggetti et al. 2018 und García et al. 2018.

Eine der größten Demonstrationsanlagen der mikroalgenbasierten Abwasseraufbereitung entstand im Zuge des FP7 ALL-GAS Projektes der europäischen Kommission (2011-2018). Mit dem Ziel der nachhaltigen Produktion von Biokraftstoffen im industriellen Maßstab wurde ein mikroalgenbasiertes Verfahren entwickelt, wobei ein kommunales Abwasser als Kulturmedium zur Kostenreduktion eingesetzt wurde. In der Pilotphase des Projektes konnten jährlich 90 Tonnen an Algenbiomasse pro Hektar Pilotreaktor (2x500 m<sup>2</sup> Raceway Pond) erzeugt und 1000 m<sup>3</sup> Abwasser pro Tag und Hektar Photobioreaktor entsprechend der europäischen Standards gereinigt werden. Die gewonnene Biomasse wurde mittels anaerober Gärung zur Biomeethanproduktion eingesetzt, wodurch der Betrieb von 10 Autos pro Hektar Kultivierungsfläche möglich war. Während der zweiten Phase des Projektes entstand eine Demonstrationsanlage (Abbildung 1-13 A) mit einer Photobioreaktorfläche von 2 ha (vier HRAP zu je 5,200 m<sup>2</sup>, Abbildung 1-13 B), wobei 2000 m<sup>3</sup> Abwasser pro Tag energiearm (< 0,2 kWh pro m<sup>3</sup> Abwasser) aufbereitet werden konnten. Die Menge an pro Hektar Kulturfläche produziertem Biomeethan erlaubte den Betrieb von 20 Autos (30,000 km pro Jahr), verglichen mit konventionellen Verfahren zur Biokraftstoffproduktion (Biodiesel oder Bioethanol) ist die Ausbeuten damit vervierfacht. (All-gas EU-Projekt 2023; Demirer und Uludag-Demirer 2022)



Abbildung 1-13: Demonstrationsanlage des All-gas EU-Projektes (A) zur Biomethanproduktion aus Mikroalgenbiomasse, welche in 2 ha Raceway Ponds (B) in einem kommunalen Abwasser kultiviert werden. Quelle: All-gas EU-Projekt 2023.

Allein in Deutschland werden pro Jahr über 5 Milliarden  $\text{m}^3$  Schmutzwasser durch Kommunen und Industrie erzeugt, welche zusammen mit circa 3 Milliarden  $\text{m}^3$  nicht-versickertem Regenwasser in den Kläranlagen aufbereitet werden müssen. (Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und nukleare Sicherheit 2023a) Diese Menge übersteigt die Kapazität der vorgestellten Pilotanlagen um ein Vielfaches. Nichtsdestotrotz zeigen diese Projekte, dass das Potential von Mikroalgen zur Abwasseraufbereitung erkannt wurde und auch Fokus künftiger Studien sein wird, um die breitflächige Anwendung mikroalgenbasierter Kläranlagen zu realisieren.

#### 1.3.2.4 Herausforderungen der Abwasseraufbereitung mittels Mikroalgen

Die großflächige Anwendung mikroalgenbasierter Verfahren zur Abwasseraufbereitung ist bisher durch eine Reihe von Herausforderungen limitiert. Hauptsächlich sind die Kultivierung im großen Maßstab (Faktoren wie Nährstoffbereitstellung, Gaseintrag und -austausch, Bereitstellung und Verteilung von Licht, Kontrolle der Kultivierungsbedingungen, Kontaminationen, ausreichende Flächenverfügbarkeit) sowie die Biomasseernte und Aufarbeitung anspruchsvoll (Christenson und Sims 2011) und können hohe Kosten verursachen. Ein ökonomisch rentabler Betrieb ist bislang hauptsächlich als Ursache genannt, welche die Integration von Algenreaktoren zur Abwasseraufbereitung hemmt. Für die konventionelle Aufbereitung werden zwischen 0,1-0,2 € pro  $\text{m}^3$  Betriebskosten behandelten Abwasser geschätzt. Verschiedene Studien haben die Kosten für eine mikroalgenbasierte Abwasseraufbereitung geschätzt und kommen zu einem ähnlichen Ergebnis: Die untersuchten Systeme haben einen hohen (elektrische) Energiebedarf für die  $\text{CO}_2$ -Begasung sowie die Umwälzung der Algenkultur. Die Kosten für Energie überstiegen dabei die einer konventionellen Anlage um einen Faktor 10-100. (Mohsenpour et al. 2021) Ein solch hoher Energieeinsatz stellt keine nachhaltige Alternative dar, nichtsdestoweniger ist eine Optimierung der bisherigen Mikroalgenkultivierungssysteme an moderne Wirtschaftsstandards keine Unmöglichkeit. Um Abwasser kosteneffizient aufzureinigen, ist eine Kultivierung der Mikroalgen in offenen Becken im Außenbereich mit einer geringen Tiefe unabdingbar.

(Nagarajan et al. 2020), woraus ein hoher Flächenbedarf entsteht, welcher oftmals nicht in den bestehenden Anlagen realisiert werden kann (Christenson und Sims 2011; Shah 2023). Zudem bedingt dies die Unterordnung an fluktuierende, natürliche Umweltbedingungen wie Temperatur, pH, Lichtintensitäten und Photoperioden (Amaro et al. 2023). In den kalten Jahreszeiten können die Umgebungstemperaturen fallen und damit das Wachstum der Mikroalgen und damit deren Nährstoffaufnahme verlangsamen (Torzillo et al. 1991). Neben den Temperaturen variieren die Lichtbedingungen sowohl im Jahreszyklus (Lichtstunden pro Tag), in den aktuellen Wetterbedingungen (Bewölkung) als auch der Tageszeit. Sowohl Lichtintensität als auch Dauer der Lichtperioden haben einen wesentlichen Einfluss auf das Mikroalgenwachstum, die damit verbundene Nährstoffaufnahme sowie das Potential zum Aufbau intrazellulärer Speicherstoffe. An Tagen mit wenig Licht kann dementsprechend eine unzureichende Abwasserreinigung auftreten. (Li et al. 2019) Zudem sind industrielle Abwässer oftmals durch eine starke Trübung und/oder dunkle Färbung charakterisiert, welche die Lichtverteilung negativ beeinflusst. Da gerade eine gute Lichtverteilung zur effektiven Nährstoffaufnahme eine zentrale Rolle spielt, sind möglicherweise zusätzliche Prozessschritte notwendig, um das entsprechende Abwasser für die Aufbereitung durch Mikroalgen vorzubereiten. (Chai et al. 2021; Abdelfattah et al. 2023; Usman et al. 2023) Im Gegensatz zu synthetischen Kulturmedien schwanken Abwässer in ihrer genauen Zusammensetzung. Für das optimale Wachstum von Mikroalgen ist das Vorhandensein einer Vielzahl von (Mikro)Nährstoffen vorausgesetzt, reale Abwässer bilden diese Vielfalt nicht immer ab und erlauben dadurch keine optimale Abwasserreinigung. (Li et al. 2019) Zudem können Schwankungen der Konzentrationen von Stickstoff und Phosphor dazu führen, dass ein physiologisch ungünstiges Verhältnis der beiden Nährstoffe keine vollständige Aufnahme aus dem Abwasser erlaubt (Beuckels et al. 2015). Viele Abwässer sind zudem mit geringen Nährstoffkonzentrationen zwischen  $4,0\text{-}40,0\text{ mg}_N\cdot\text{L}^{-1}$  und  $0,15\text{-}9,2\text{ mg}_P\cdot\text{L}^{-1}$  (Li et al. 2019; Luo et al. 2017; Zhang et al. 2019) charakterisiert. Unter der Annahme eines theoretischen Stickstoffgehaltes von 10 % sind mit diesen Abwässern als Kulturmedium lediglich Biomassekonzentrationen zwischen  $\sim 40\text{-}400\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  erreichbar. Hinsichtlich einer weiteren Wertschöpfung der Algenbiomasse werden hohe Zellkonzentrationen angestrebt, um einerseits die Produktivität des Prozesses und andererseits Biomasseaufarbeitung zu optimieren (Abdelfattah et al. 2023).

Abwasser entsteht Tag und Nacht, dementsprechend muss dieses im Verlauf von 24 h kontinuierlich aufgereinigt werden. Die Abwesenheit von Licht in der Nacht reduziert die Effektivität mikroalgenbasierter Aufbereitungssysteme und führt zu unzureichend geklärtem Wasser. Eine Lagerung von Abwässern ist kompliziert und führt zu einer Reihe neuer Herausforderungen. Die vielen Studien zum Thema Abwasserbehandlung mit Mikroalgen sind zumeist auf den Satzbetrieb im Labormaßstab beschränkt und klammern diese Problematik damit aus. Ein möglicher Ansatz ist die Rückführung von Zellen im kontinuierlichen Kultivierungsprinzip durch Einsatz eines sogenannten Membran-Photobioreaktors (vgl. Kapitel 1.3.3.2). Dieser verhindert ein Auswaschen der Mikroalgenzellen in der Nacht und kann zudem als Werkzeug zur Beeinflussung der Biomassekonzentration im Reaktor angewandt werden. Die Fähigkeit von Mikroalgen zur Bildung intrazellulärer Energiespeicher (Stärke und Lipide) ist ein weiterer Freiheitsgrad zur Realisierung einer kontinuierlichen Abwasseraufbereitung. Grundlage hierfür ist eine an die herrschenden Umweltbedingungen angepasste Prozessführungsstrategie zur maximalen Ausnutzung des vorhandenen Lichts und ist ein Teil der Zielstellung der vorliegenden Arbeit.

### 1.3.3 Membranverfahren in der Mikroalgenkultivierung

#### 1.3.3.1 Einsatz von Membranen zur Mikroalgenabtrennung

Die großtechnische Produktion von Mikroalgenbiomasse ist bis heute auf wenige Anwendungen aufgrund einer Reihe von Schwierigkeiten limitiert. Zu diesen zählen ein hoher Wasser-, Nährstoff- und Flächenbedarf sowie verschiedene Herausforderungen der Kultivierungs- und Erntesysteme. (Christenson und Sims 2011; Zhao et al. 2023) Speziell an die Mikroalgenabtrennung werden dabei zwei Hauptanforderungen gestellt: eine effiziente Biomassegewinnung mit hohen Ausbeuten bei möglichst geringem Energiebedarf. Zudem sollte das Verfahren universell auf eine Vielzahl von Mikroalgenarten anwendbar sein, wobei die Verarbeitung großer Mengen bei geringen Betriebs- und Wartungskosten gefordert wird. Zu den gängigen Ernteverfahren zählen neben der Zentrifugation die auf Flockung basierende Sedimentation sowie die Filtration mittels Membranen. (Zhao et al. 2023; Zhang et al. 2019) Bislang ist die Abtrennung von Mikroalgen – methodenunabhängig – allerdings noch sehr technologie-, energie- und kostenintensiv (Bux und Chisti 2016), oftmals wird der Anteil an den Produktionskosten auf bis zu 30 % quantifiziert (Molina Grima et al. 2003). Neue Technologien können diesen Anteil auf 3-15 % reduzieren, wie eine technisch-wirtschaftliche Evaluation verschiedener Abtrennverfahren aus dem Jahr 2018 ergab (Fasaei et al. 2018). Verglichen mit dem Energiegehalt trockener Biomasse ist die für deren Erzeugung benötigte Energie sehr hoch, wodurch der Einsatz von Mikroalgenbiomasse auf hochpreisige Produkte ( $> \$10.000 \text{ t}^{-1}$ ) limitiert ist (Alam und Wang 2019). Um ein wirtschaftlich tragfähiges und ökologisch nachhaltiges Produktionsverfahren mit Mikroalgen zu entwickeln, ist also vor allem der Energiebedarf der Erntemethode zu reduzieren. Um das Ziel eines energiearmen Betriebs zu erreichen, werden häufig zweistufige Verfahren zur Algenabtrennung angewandt: Eine Vorkonzentration (Eindickung) im ersten Schritt gefolgt von der eigentlichen Entwässerung im zweiten Schritt. Ein typisches Beispiel für ein solches Verfahren ist die Kombination aus Membranfiltration und anschließender Zentrifugation, wobei der Energiebedarf um bis zu 96 % reduziert werden kann. (Ortiz Tena et al. 2021; Zhao et al. 2023)

Mikroalgenkulturen werden im großen Maßstab zur Kostenreduktion in der Regel im Außenbereich kultiviert, wodurch lediglich niedrige Biomassekonzentrationen von etwa 0,5-3 g Trockengewicht pro Liter erreicht werden (Zhao et al. 2023; Zhang et al. 2019). Diese liegen somit um einen Faktor 20 unterhalb der erzielbaren Konzentrationen klassischer heterotropher Kultivierungen. Die Aufarbeitung der Algenbiomasse – insbesondere bei kleinen, einzelligen Stämmen – erfordert damit die Entfernung großer Wassermengen. (Barros et al. 2015; Molina Grima et al. 2013; Muylaert et al. 2017) Die meisten Mikroalgenzellen sind durch eine geringe Zellgröße im Bereich von 1-10  $\mu\text{m}$  (Mata et al. 2012) und wasserähnliche Zelldichten (Meeresalgen:  $1030\text{-}1100 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ , Süßwasseralgen:  $1040\text{-}1140 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$  (Al Hattab 2015)) charakterisiert. Beide Eigenschaften resultieren in langsamen Absetzgeschwindigkeiten gemäß des Stokes'schen Gesetzes (Uduman et al. 2010; Alam und Wang 2019; Bux und Chisti 2016) und erschweren damit den Abtrennprozess – insbesondere bei auf Sedimentation beruhenden Verfahren wie der Zentrifugation.

Obwohl die Zentrifugation sehr kosten- und energieaufwändig ist, ist sie aufgrund der hohen Effizienz und Schnelligkeit oftmals die Methode der Wahl zur Aufarbeitung von Mikroalgen-suspensionen – vor allem für hochpreisige Produkte. Zu den weiteren Nachteilen zählt die hohe

Scherbelastung für die Zellen. Die auf Flockung basierende Sedimentation oder Flotation gilt als die ökonomischste Methode zur Mikroalgenabtrennung. Als nachteilig gelten die vergleichsweise geringe Ernteeffizienz, lange Sedimentationszeiten sowie die hohe Dosierung und Toxizität von Flockungsmitteln. Gerade der Einsatz von Hilfsstoffen reduziert den Anwendungsbereich der Methode, da die Reinheit bzw. Qualität der Mikroalgenbiomasse beeinträchtigt wird. (Zhao et al. 2023; Christenson und Sims 2011)

Die Membranfiltration wird als einfache physikalische Methode der fest-flüssig Trennung und damit als sensitive und energiearme Alternative für die Algenabtrennung genannt. (Zhang et al. 2019) Membranen stellen eine selektive Barriere dar, wobei Wasser passieren kann, die Algenzellen allerdings zurückgehalten werden, wodurch deren Konzentration in der Kultur ansteigt. Für die Mikroalgenabtrennung sind Mikrofiltrations- (MF; 0,1-10 µm Porendurchmesser) und Ultrafiltrationsmembranen (UF; 1-100 nm Porendurchmesser) etabliert. (Mo et al. 2015) Die Membranfiltration ist für dünne Algenkulturen verschiedenster Spezies geeignet und außerdem durch eine hohe Ernteeffizienz von bis zu 100 % Zellrückhaltung charakterisiert. (Ortiz Tena et al. 2021; Zhao et al. 2023) Zudem zählen ein einfacher Betrieb und die gute Übertragbarkeit bei Maßstabsvergrößerungen zu den weiteren Vorteilen. Der fehlende Chemikalieneinsatz und die damit einhergehende kontaminationsfreie flüssige Phase der Membranfiltration vereinfachen nachfolgende Aufarbeitungsschritte und erweitern das Anwendungsspektrum der Methode (z.B. Nahrungsmittel, Futtermittel, Pharmazeutika, etc.). Weiterhin gilt sie als sensitive Methode, welche die Vitalität der abgetrennten Zellen erhält und damit für besonders empfindliche, schersensitive Mikroalgenspezies geeignet ist. (Mo et al. 2015; Zhang et al. 2019). Die größte Herausforderung beim Einsatz von Membranfiltration zur Mikroalgenabtrennung ist das sogenannte Membran-Fouling. Durch das Verblocken der Membranporen und/oder die Ausbildung eines Filterkuchens wird der Energiebedarf der Filtration erhöht, wodurch die Wirtschaftlichkeit des Verfahrens sowie die Effizienz des Abtrennprozesses sinken. (Zhang et al. 2019) Die Mechanismen des Foulings sowie Maßnahmen zur Reduktion sind in Abschnitt 1.3.3.3 im Detail erläutert.

Im Bereich der mikroalgenbasierten Abwasseraufbereitung ist der Einsatz von Membranen bereits etabliert. Neben der Abtrennung der Algenzellen vom geklärten Wasser wird dieses durch die Filtration zudem von Mikroorganismen desinfiziert. (Mo et al. 2015) Membranen werden allerdings nicht nur zur reinen Mikroalgenernte eingesetzt, sondern auch als Werkzeug zur Steuerung des Kultivierungsprozesses verwendet. Die Kopplung eines Photobioreaktors mit einem Membranmodul resultiert in einem sogenannten Membran-Photobioreaktor (MPBR), dessen Konzept im folgenden Kapitel 1.3.3.2 beschrieben ist.

### 1.3.3.2 Konzept Membran-Photobioreaktor

Membranbioreaktoren (MBR) sind in der Abwasseraufbereitung als Alternative zu Belebtschlammverfahren für die Behandlung kommunaler und industrieller Abwässer bereits seit langem anerkannt. (Le-Clech et al. 2006) Das Konzept eines MBR kombiniert einen kontinuierlich betriebenen Bioreaktor mit einer Mikro- oder Ultrafiltrationsmembraneinheit zur Fest-Flüssig-Trennung (Luo et al. 2017). Allgemein formuliert erlaubt die MBR-Technologie die gleichzeitige biologische Umsetzung von Substraten sowie die fest-flüssig Trennung mittels

Membranfiltration (Le-Clech et al. 2006). MBR-Systeme ermöglichen eine Entkopplung der Verweilzeiten von Feststoffen (SRT) und Flüssigkeiten (HRT), wodurch sich im Vergleich zu konventionellen Verfahren viele Vorteile ergeben: Neben einem geringeren Platzbedarf mit moderatem apparativem Aufwand, kann eine hohe Abwasserqualität ohne Keimbelastung oder Feststoffen erreicht werden. Zudem wird ein höherer volumetrischer Durchsatz an Abwasser bei einer gesteigerten Substrataufnahme aufbereitet. (Le-Clech et al. 2006; Luo et al. 2017; Melin et al. 2006). Auch erlaubt die Zellrückhaltung oder -führung die Anwendung hoher Verdünnungsraten oberhalb der maximalen spezifischen Wachstumsrate der eingesetzten Mikroorganismen, ohne dass ein Auswaschen der Biomasse aus dem Reaktor auftritt. (Bilad et al. 2014a) Die großtechnische Anwendung von MBR's in der konventionellen Abwasserbehandlung wird bis heute allerdings limitiert durch die hohen Kosten für Installation und Betrieb sowie des im Betrieb auftretenden Membran-Fouling (vgl. Kapitel 1.3.3.3), welches ein hohes Maß an In-Prozess-Wartung und eine vorsichtige Prozessführung bedingt (Melin et al. 2006; Luo et al. 2017).

Wird die Membrantechnologie in der Mikroalgenkultivierung eingesetzt, resultiert die Kombination aus Photobioreaktor und Membran in einem sogenannten Membran-Photobioreaktor, kurz MPBR. Die beiden Hauptkonfigurationen eines Membran-Photobioreaktorsystems sind in Abbildung 1-14 dargestellt. Beide Konfigurationen ermöglichen einen kontinuierlichen Betrieb. Abbildung 1-14 (A) zeigt einen MPBR mit Rezirkulation zu einem externen Membranmodul. Diese Konfiguration ermöglicht im Vergleich zum getauchten MPBR (Abbildung 1-14: (B)) eine bessere Prozesssteuerung durch die Rückführung von Biomasse bei einer höheren Fehleranfälligkeit. Der Austausch des Membranmoduls ist bei einem getauchten MPBR dagegen komplizierter. Zudem kann die interne Membran die Lichtverteilung im Reaktor negativ beeinflussen und damit das Mikroalgenwachstum limitieren. (Bilad et al. 2014a)

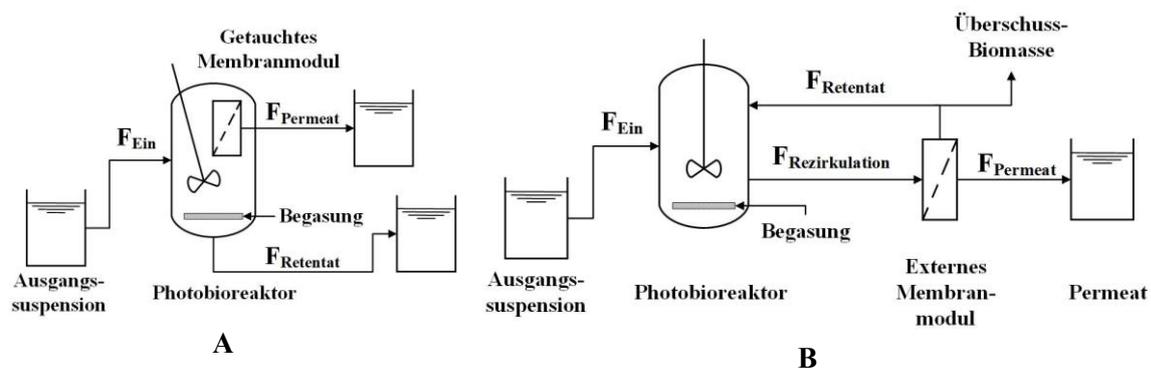


Abbildung 1-14: Mögliche Konfigurationen eines Membran-Photobioreaktors (MPBR) mit internem, getauchtem (A) oder externem (B) Membranmodul. Quelle: Eigene Abbildung erstellt nach Zhao et al. 2023 und Melin et al. 2006.

Durch die Rezirkulation von Retentat kann – je nach Konfiguration des Systems – ein volumetrischer Reduktionsfaktor (getauchte Membran, Gleichung (1.4)) oder Rückführverhältnis (externe Membran, Gleichung (1.5)) zur Quantifizierung der Zellrückführung eingeführt werden.

$$RV = \frac{F_{\text{Rezirkulation}}}{F_{\text{Ein}}} \quad (1.4)$$

$$v = \frac{F_{\text{Ein}}}{F_{\text{Retentat}}} \quad (1.5)$$

Marbelia et al. 2014 sowie Bilad et al. 2014b simulierten das Wachstum von Mikroalgen sowohl in einem konventionellen PBR- als auch in einem MPBR-System (Abbildung 1-15) mit getauchter (Marbelia et al. 2014) bzw. externer Membraneinheit (Bilad et al. 2014b). Die Simulation basiert auf Massenbilanzen kontinuierlicher Kultivierungen im Gleichgewichtszustand mit einem wachstumslimitierenden Substrat (Stickstoff), wobei die Substrataufnahme einer Michaelis-Menten-Kinetik folgt. Die Neubildung von Biomasse wird über einen Ausbeutekoeffizienten von Substrat zu Biomasse berücksichtigt und zudem durch die maximale spezifische Wachstumsrate  $\mu_{\text{max}}$  begrenzt. Beide Werte sind stammspezifisch und werden von den jeweiligen Kultivierungsbedingungen beeinflusst.

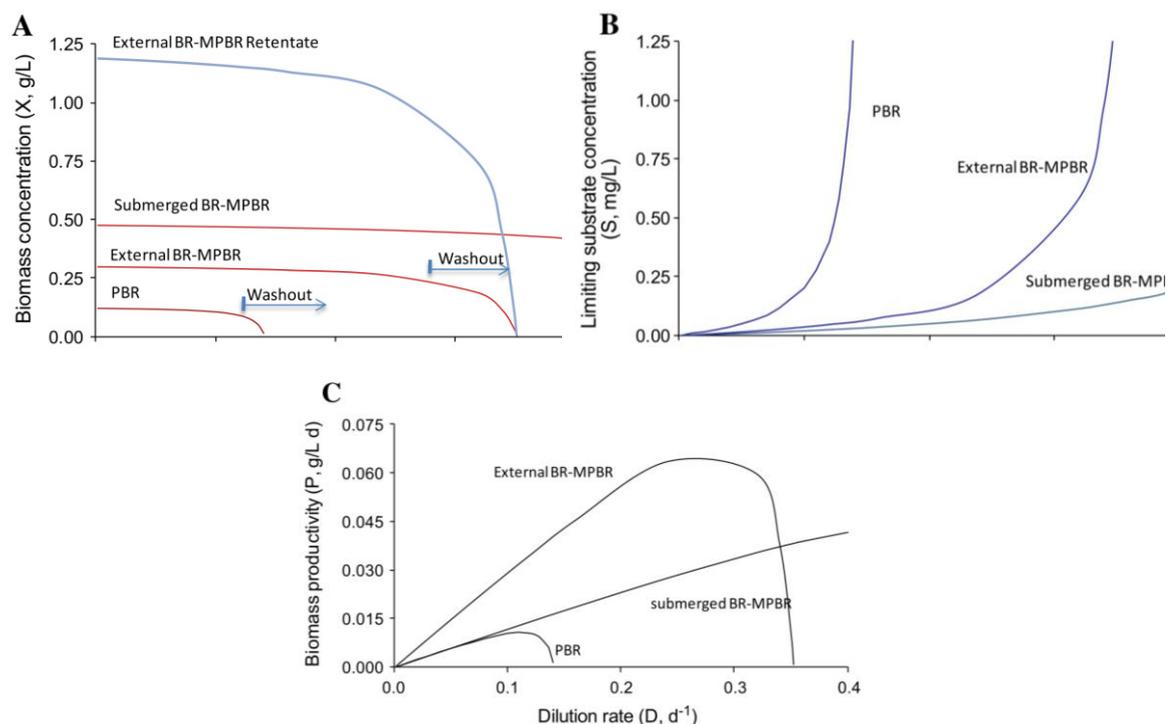


Abbildung 1-15: Simulation eines Modell-PBR sowie von MPBR mit interner und externer Filtrationseinheit. (A) Biomassekonzentration (im Bild: X) in (M)PBR und Retentat, (B) Konzentration des limitierenden Substrates (im Bild: S) im Reaktor und (C) Biomasseproduktivität (im Bild: P). Simulationsparameter:  $v_{\text{MPBR}} = 4$ ,  $RV = 0,2$ ,  $\mu_{\text{max}} = 0,15 \text{ d}^{-1}$ ,  $Y_{X,S} = 77 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $S_0 = 1,55 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $K_S = 0,1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . Quelle: Bilad et al. 2014a.

Ein Einsatz eines MPBR-Systems erlaubt – unabhängig der Membrankonfiguration – eine Anwendung höherer Durchflussraten im Vergleich zu einem klassischen Photobioreaktor (Abbildung 1-15 A), bevor ein Auswaschen der Zellen auftritt. Zudem ist durch den Einsatz eines MPBR die Aufnahme des wachstumslimitierenden Substrates verbessert (Abbildung 1-15 B), was das Potential dieses Reaktorsystems für einen Einsatz zur Abwasseraufbereitung unterstreicht. Dennoch muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass in der vorliegenden Simulation das Substrat „Licht“ als Alleinstellungsmerkmal phototropher Kultivierungen nicht mitberücksichtigt wurde. Die Verfügbarkeit an im Medium gelösten Komponenten steigt mit zunehmender Verdünnungsrate, wodurch höhere Wachstumsraten und Biomasseproduktivität (Abbildung 1-15 C) möglich sind. Allerdings bleibt die Menge an eingetragenen Photonen konstant, die Photonenverfügbarkeit pro Zelle ist durch die im Reaktor herrschende Biomassekonzentration definiert. Dabei können vor allem hohe Zellkonzentrationen ( $> 1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) dazu führen, dass das gesamte eingestrahlte Licht in den der Lichtquelle zugewandten Reaktorschichten absorbiert wird und damit in den dahinter liegenden Schichten Dunkelzonen entstehen. Bei einem photoautotrophen Mikroalgenwachstum spielt die Verfügbarkeit der Energiequelle eine wesentliche Rolle für Wachstum und Metabolismus einer Mikroalgenzelle. Dunkelzonen verlangsamen den Mikroalgenmetabolismus und/oder rufen Zellstress hervor. (Luo et al. 2017) Zudem ist die Aufnahme von Nährstoffen, wie in Kapitel 1.3.1.5 beschrieben, ein für die Mikroalge energieaufwändiger Prozess (Phosphor) bzw. bedingt den aktiven Einbau in die Zelle (Stickstoff). Daher kann die Nährstoffaufnahme auch bei einer stetigen Erhöhung der Zellkonzentration nicht wie in der Simulation eines getauchten MPBR in Abbildung 1-15 B angedeutet unlimitiert gesteigert werden. Da MPBR-Systeme zumeist bei hohen Zelldichten betrieben werden, sind Lichtverteilung und -verfügbarkeit bei dessen Konstruktion und Implementierung unbedingt zu berücksichtigen und optimieren.

Eine Möglichkeit zur Verbesserung der Lichtverteilung in einem Photobioreaktor ist die Anpassung der Schichtdicke (Legrand et al. 2021). Durch eine Reduktion der Reaktordicke von 25 cm auf 10 cm optimierten González-Camejo et al. 2020 den Lichtweg eines MPBR (Hohlfasermembran) im Pilotmaßstab im Außenbereich. Die Ergebnisse der Studie zeigten eine verbesserte Nährstoffaufnahme von Stickstoff und Phosphor (150 % für N, 103 % für P) und Biomasseproduktivität (194 %) sowie eine gesteigerte Photosyntheseeffizienz (67 %). Diese Verringerung ging zudem mit einer Kostenreduktion der Anschaffung und im Betrieb einher. Die Mikroalgenzellen der Spezies *Scenedesmus* sp. konnten dabei bei einer SRT zwischen 3-4,5 d und einer HRT zwischen 1,25-1,5 d die Nährstoffe Stickstoff und Phosphor mit Raten von  $29,7 \text{ mg}_N\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  bzw.  $3,8 \text{ mg}_P\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  aus einem anaeroben MBR Effluent entfernen und somit die gesetzlichen Grenzwerte einer Einleitung in natürliche Gewässer einhalten. Die Lichtverfügbarkeit zur optimalen Nährstoffaufnahme aus einem tertiären Effluent wurde von für González-Camejo et al. 2019 verschiedene Biomassekonzentrationen untersucht – realisiert durch eine Variation der SRT (4,5 d, 6 d und 9 d). Dabei konnte bei einer SRT von 4,5 d (mit der geringsten Zelldichte) die höchste Stickstoffaufnahme bezogen auf die Photonenabsorptionsrate ( $57,7 \text{ mg}_N\cdot\text{mol}^{-1}$ ) sowie Photosyntheseeffizienz (4,4 %) nachgewiesen werden. Die Ergebnisse unterstreichen die Lichtabhängigkeit der Stickstoffaufnahme in Mikroalgen und die Notwendigkeit der Anpassung der Lichtverteilung in MPBR-Systemen. Eine darauffolgende Variation der HRT (3,5 d, 2,0 d, 1,5 d und 1,0 d) ergab, dass lediglich eine Verweilzeit von 3,5 d (entspricht  $D \sim 0,3 \text{ d}^{-1}$ ) eine ausreichende Nährstoffreduktion für die Einleitung des

Effluents in natürliche Gewässer erzielen konnte. Aufgrund der bei konstanter SRT gleichbleibenden Biomassekonzentration war kein Einfluss der HRT auf die Effektivität der Lichtnutzung bezüglich der Nährstoffaufnahme erkennbar.

Die Anwendung membranbasierter Verfahren zur effizienten Abwasserbereitung war und ist Gegenstand zahlreicher weiterer Untersuchungen (z.B. Boonchai und Seo 2015, Gao et al. 2016a, Gao et al. 2016b, Viruela et al. 2018, Azizi et al. 2020 oder Solmaz und Işık 2020), welche einen wichtigen Beitrag in der großflächigen Etablierung dieser Systeme leisten. Nichtsdestoweniger kommt es im laufenden Betrieb eines Membran-Photobioreaktors zu einer Anhaftung gelöster und fester Partikel an der Membranoberfläche und in den Membranporen, wodurch deren Filtrationsleistung reduziert wird. Dieser als Membran-Fouling definierte Mechanismus sowie Maßnahmen zu dessen Reduktion sind Gegenstand des nachfolgenden Kapitels 1.3.3.3.

### 1.3.3.3 Herausforderung Membran-Fouling

Bei der Filtration partikelbeladener Suspensionen, welche neben Zellen auch Zellbruchstücke (Debris) sowie gelöste organische Substanzen (extrazelluläres organisches Material, EOM) enthalten, treten Wechselwirkungen zwischen Membranoberfläche und den enthaltenen Stoffen auf. Die Bildung des sogenannten Foulings findet sowohl an der Membranoberfläche (Kuchenbildung) als auch innerhalb der Membranporen (Porenverblockung) statt. Der Widerstand, welchen das Permeat nun überwinden muss, wird dadurch erhöht. Je nach Betriebsweise der Filtration (konstanter Permeat-Flux/konstanter TMP) ist eine höhere Triebkraft (gleichbedeutend mit einem erhöhten Energieeintrag) erforderlich beziehungsweise sinkt der erzielbare Permeat-Flux (entspricht einem Effizienzverlust). Daher sind Maßnahmen zur Prävention sowie Kontrolle des Membran-Foulings erforderlich. Fouling Phänomene können anhand ihrer Reversibilität eingeteilt werden (Abbildung 1-16): Physikalische Maßnahmen befreien die Membran von reversiblen Foulings, irreversibles Fouling hingegen ist lediglich durch chemische Reinigung zu entfernen. Algenzellen bilden einen in der Regel reversiblen Filterkuchen auf der Membran, wohingegen EOM eine Gelschicht auf der Membranoberfläche bildet und die Membranporen teilweise irreversibel infiltrierte. Die Interaktion zwischen Zellen und EOM führt zu einem dichten Filterkuchen, welcher durch physikalische Maßnahmen allein nicht vollständig entfernt wird und damit zusätzlich irreversibles Fouling erzeugt. (Rezakazemi et al. 2018; Zhang und Fu 2018; Le-Clech et al. 2006)

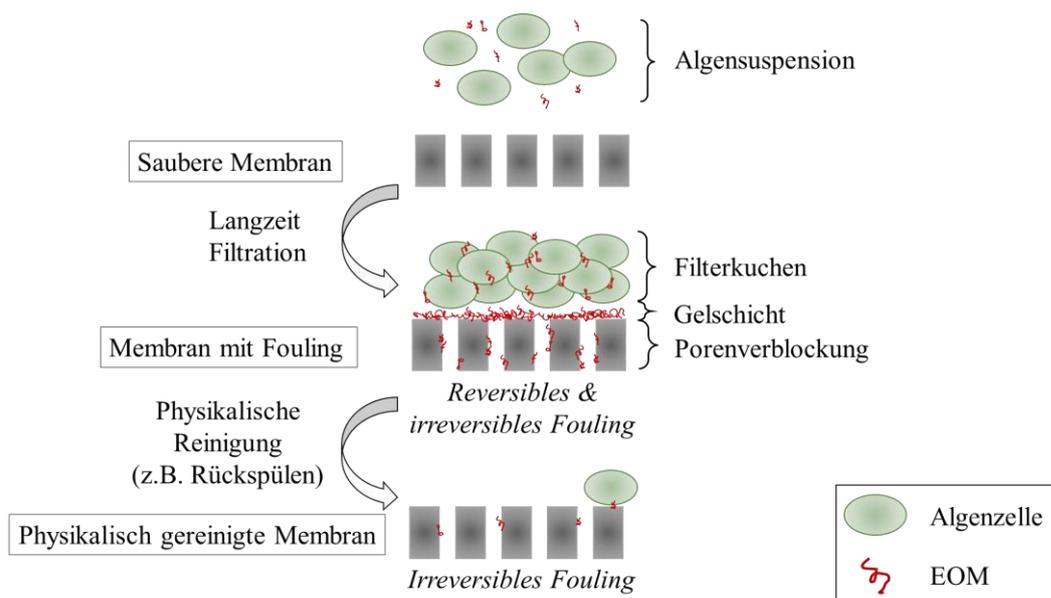


Abbildung 1-16: Mechanismen des Membran Foulings, welches durch Algenzellen und EOM verursacht wird. Quelle: eigene Darstellung nach Rezakazemi et al. 2018, Zhang und Fu 2018, Drexler und Yeh 2014 und Wang et al. 2014.

Für einen ökonomischen und ökologischen Betrieb einer Filtrationsanlage ist die Optimierung der Anti-Fouling Maßnahmen essenziell. Zu den physikalischen Anti-Fouling Maßnahmen zählen neben der Membranbelüftung das sogenannte Rückspülen sowie Pausieren (Le-Clech et al. 2006). Generell wird bei diesen Maßnahmen lediglich reversibles Fouling entfernt. Die Belüftung der Membran ist eine effektive Maßnahme, um Fouling sowohl in seiner Entstehung zu verlangsamen als auch zu kontrollieren. Durch Luftblasen erzeugte Scherkräfte lösen den sich aufbauenden Filterkuchen und reduzieren die entlang der Membran auftretende Konzentrationspolarisation durch den Rücktransport fester Partikel in die umgebende Phase. (Fortunato et al. 2020; Wang et al. 2014)

Im laufenden Betrieb der Filtration kann Rückspülen zu einer Reduzierung von Fouling Phänomenen führen. Bei dieser Flussumkehr des Permeat-Stromes wird das Permeat rückwärtig durch die Membranporen gepresst, wodurch es zu einem Abplatzen des Filterkuchens an der Membranaußenseite kommt. Wird die Membran während des Rückspülens zusätzlich belüftet, wird dessen Effektivität maßgeblich verbessert (Vera et al. 2015). Die Stellschrauben des Rückspülens umfassen die Dauer und Frequenz des Vorgangs, sowie deren Verhältnis und Intensität (Villarroel et al. 2013; Le-Clech et al. 2006). Generell gilt: je länger rückgespült wird, umso besser ist der Reinigungseffekt. (Vera et al. 2015) Ab einem Schwellenwert allerdings kann auch bei längerem Rückspülen keine Verbesserung der physikalischen Reinigung erzielt werden. Um eine Verdünnung des Retentats so gering wie möglich zu halten, werden für den Filtrationsprozess möglichst kurze Rückspüldauern bei geringen Rückspülvolumina gewünscht. Zudem reduziert die Dauer des Rückspülens die effektive Filtrationszeit. Ein vorsichtiges Abwägen zwischen der Effektivität der physikalischen Reinigung und der Effizienz des Filtrationsprozesses ist bei der Auswahl einer geeigneten Rückspülstrategie unbedingt notwendig.

Als schonende Maßnahme zur Reduktion von Membran-Fouling gilt das sogenannte Pausieren. Hierbei wird der Permeat-Flux periodisch unterbrochen und der Filtrationsprozess damit pausiert. Durch die Abwesenheit der Triebkraft, kann eine Rückdiffusion der festen Partikel (Zellen) entlang der Grenzschicht der Membranoberfläche in die umgebende Phase stattfinden, wodurch deren Konzentration in der direkt an die Membran angeschlossenen Flüssigphase verringert und damit die Ausbildung eines Filterkuchens verlangsamt wird. Zudem verändert das Pausieren die physikalischen Eigenschaften des Filterkuchens hin zu einer zunehmend ungeordneten, weniger dichten Struktur, wodurch dessen hydraulischer Widerstand reduziert wird. (Fortunato et al. 2020; Le-Clech et al. 2006) Werden die Membranfasern gleichzeitig belüftet, wird dieser Effekt verstärkt, zudem wird die Ablösung eines bereits vorhandenen Kuchens begünstigt. (Drews 2010; Le-Clech et al. 2006; Kanchanatip et al. 2016) Die Anwendung periodischer Pausen ist gegenüber anderen Methoden wie zum Beispiel Rückspülen vorteilhaft, da diese keine zusätzliche (mechanische) Beanspruchung der Zellen bedeutet und mit keiner Erhöhung des Energiebedarfs oder -eintrags verbunden ist. Dennoch darf nicht unerwähnt bleiben, dass das Pausieren im Vergleich zum Rückspülen zumeist weniger effektiv ist. Dauer und Frequenz des Pausierens sind zu optimieren, um keine unnötige Verlängerung des Filtrations-Prozesses hervorzurufen. (Wang et al. 2014)



# 2 Material und Methoden

## 2.1 Mikroorganismen

### 2.1.1 Mikroalgen Spezies

#### *Chlorella vulgaris*

Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Stämme der Grünalge *Chlorella vulgaris* eingesetzt.

Die Grünalge *C. vulgaris* SAG 211-12 (Abbildung 2-1; Gruppe Chlorophyta, Gattung Trebouxiophyceae) stammt aus der Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen (Experimental Phycology and Culture Collection of Algae at the University of Goettingen (EPSAG) 2023). Sie fand für verschiedene Kultivierungs- sowie Filtrationsexperimente im Labormaßstab Einsatz (Kapitel 3.3.1, Kapitel 3.4.1 und Kapitel 5.2.1) und wurde hauptsächlich in einem 2 L Photobioreaktor (Kapitel 2.5) kultiviert.

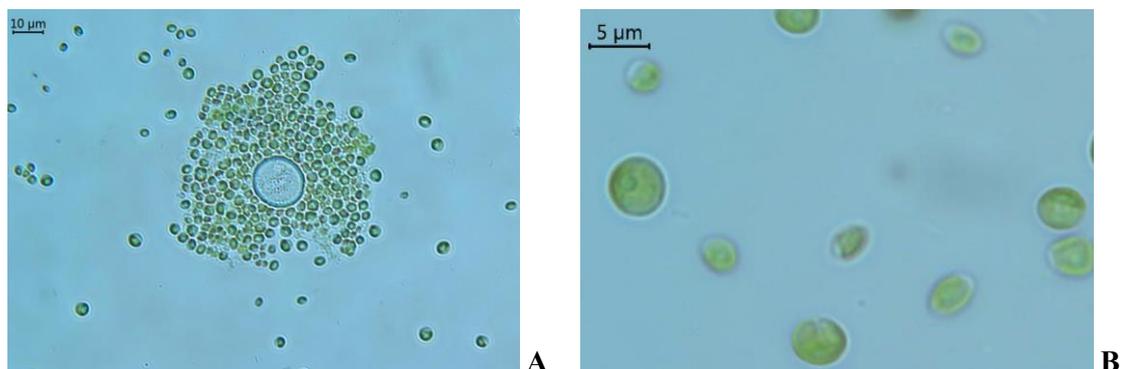


Abbildung 2-1: Mikroskopische Aufnahmen der Grünalge *Chlorella vulgaris* SAG 211-12 in verschiedenen Maßstäben. Quelle: eigene Aufnahmen.

Der Produktionsstamm *Chlorella vulgaris* 1996/H 14 Doucha et Livansky, Patent-Nummer 299352 (kurz *C. vulgaris* H14) (Doucha und Lívanský 2012) wurde für Filtrationsexperimente im Pilotmaßstab verwendet (Kapitel 3.1.1 und Kapitel 3.2.3). Der Stamm wurde vom Institut für Mikrobiologie des ASCR der Akademie der Wissenschaften, Prag, Tschechische Republik durch ein „Materials Transfer & Evaluation Agreement“ zur Verfügung gestellt. Die Bereitstellung der Biomasse erfolgte durch die axenische Kultivierung in Acetat- und Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)-freiem TAP-Medium (nach Gorman und Levine 1965 und Hutner et al. 1950, Zusammensetzung siehe Tabelle 8-2 im Anhang) in einem geschlossenen 33 L Photobioreaktor („Algine-Reaktor“, Abbildung 2-2 A) mit einem Kulturvolumen von 28 L bei pH 7,5, 25 °C, Begasungsrate 1,1 vvm (1 % (v/v) CO<sub>2</sub>), interner Beleuchtung mit Lichtintensitäten von bis zu 500 µmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> statt.

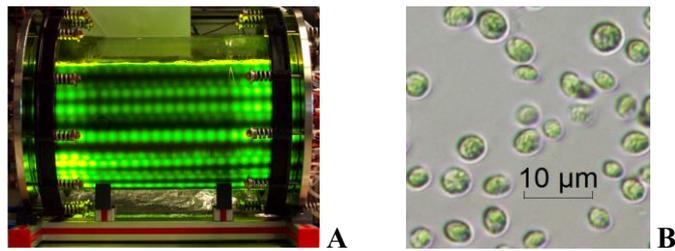


Abbildung 2-2: Algine-Photobioreaktor mit interner Beleuchtung (A) sowie mikroskopische Aufnahmen der Mikroalge *C. vulgaris* H14 (B). Quelle: Institutsinterne Aufnahmen.

Der Stamm *Chlorella vulgaris* R-117 (CCALA 1107, Stammsammlung autotropher Organismen des Instituts für Botanik Třeboň, Tschechische Republik) wurde nicht-axenisch in anorganischem Medium im Juli 2020 im Centre Algatech des Instituts für Mikrobiologie der Tschechischen Akademie der Wissenschaften in Třeboň, Tschechische Republik in einer Dünnschicht-Kaskade im Außenbereich (Kulturvolumen 650 L, pH  $8,0 \pm 0,2$ ; siehe Abbildung 2-3) kultiviert (Masojídek et al. 2011). Die Algenbiomasse wurde für Filtrationsexperimente in Kapitel 2.7.3 und Kapitel 3.1.1 eingesetzt.

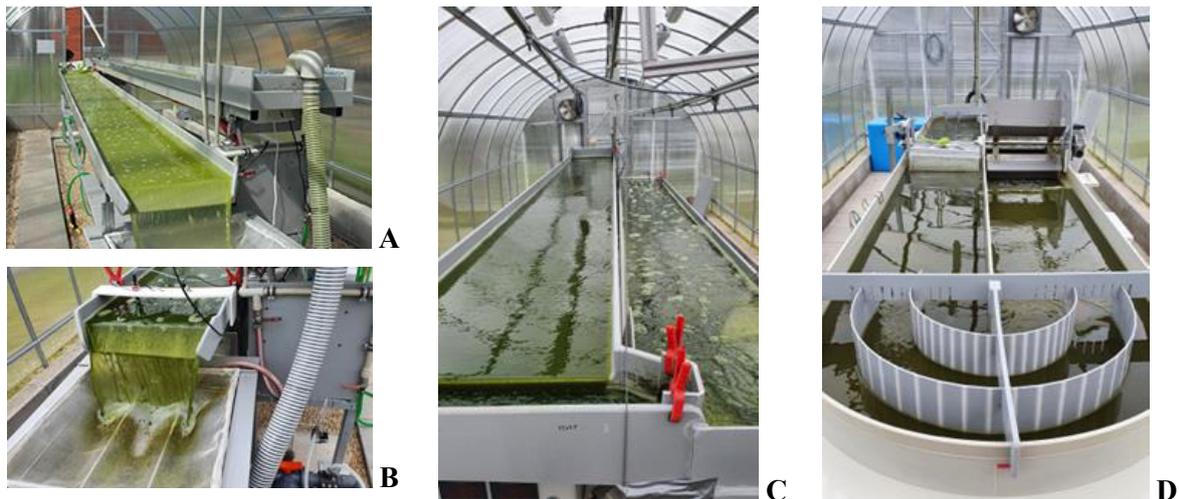


Abbildung 2-3: Dünnschicht-Kaskade zur Mikroalgenkultivierung der Grünalge *Chlorella vulgaris* R-117. Die Kultivierung erfolgte im Centre Algatech des Instituts für Mikrobiologie der Tschechischen Akademie der Wissenschaften in Třeboň, Tschechische Republik. Quelle: InoWeb 2023 (Bild A) sowie eigene Aufnahmen (Bild B-D).

## 2.1.2 Bäckerhefe

Als Modellsubstanz für Filtrationsexperimente diente die kommerziell erhältliche Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) (Deutsche Hefewerke GmbH (DHW), Vital Gold), mit einem Zelldurchmesser zwischen 5 - 10 µm. Für die Hefewürfel (42 g) wurde ein durchschnittlicher Trockenmassegehalt von 27 % ermittelt. Die erforderliche Biotrockenmassekonzentration einer Hefesuspension wurde durch Auflösen einer definierten Menge an Hefewürfel in einem entsprechenden Medium (Kulturmedium oder Puffer, Herstellung siehe Kapitel 2.2) erreicht.

Einen Überblick der in den Experimenten der vorliegenden Arbeit eingesetzten Biomassekonzentrationen und Medien gibt Tabelle 2-1:

Tabelle 2-1: Überblick der Filtrationsexperimente mit *Saccharomyces cerevisiae*.

Experiment Bezeichnung	Referenzkapitel	Biotrockenmasse-Konzentration (g·L <sup>-1</sup> )	Medium
Kritischer Flux	3.2.3	3,0 und 15,0	Puffer
Rückspülen	3.3.1	2,5	Bold Basal Medium
Pausieren	3.3.2	3,0	Puffer

## 2.2 Medien und Puffer

Die Qualität der eingesetzten Chemikalien wird laut Herstellern als analysenrein angegeben. Eine ausführliche Liste der verwendeten Chemikalien sowie deren Hersteller ist im Anhang (Tabelle 8-7) zu finden. Für die eingesetzten Medien und Puffer wurde ausschließlich Reinstwasser (Widerstand  $\geq 16 \text{ M}\Omega$  bei Raumtemperatur (RT)) eingesetzt. Nach der Einstellung des gewünschten pH-Wertes wurden alle Medien für 20 min bei 121 °C in einem Laborautoklav sterilisiert und bis zur Verwendung in einem Kühlschrank gelagert.

### Bold Basal Medium

Als Standard-Kulturmedium für Mikroalgen fand das Bold Basal Medium (BB-Medium) nach Bischoff, H. W. & Bold, H. C. 1963 (modifiziert nach Starr und Zeikus 1993 und Andersen 2009) bei pH 7,5 Einsatz. Die Gehalte der einzelnen Komponenten des Mediums sind in Tabelle 8-1 im Anhang aufgeführt.

### Modifiziertes BG11-Medium (synthetisches Abwasser)

In Abgleich mit aktueller Literatur wurde das sogenannte Blue Green 11 (BG11) Medium nach Stanier et al. 1971 als synthetisches Abwasser ausgewählt und modifiziert. Das so entstandene mBG11-Medium (modifiziertes BG11-Medium) enthält keinerlei Kohlenstoffquellen. Zudem sind die Stickstoff- und Phosphorkonzentrationen zur Bildung von 0,5 g·L<sup>-1</sup> Biomasse ausgelegt (Annahmen: Stickstoffgehalt einer Algenzelle 10 %, Phosphorgehalt 2 %). Die Konzentrationen der einzelnen Komponenten des Mediums sind in Tabelle 8-3 im Anhang aufgeführt. Für die Versuche zur Untersuchung der Nährstoffaufnahme in Abhängigkeit der Wachstumsrate im kontinuierlichen Kultivierungsbetrieb (Kapitel 4) wurde das Medium 4-fach konzentriert, so dass eine theoretische Biomassekonzentration von 2 g·L<sup>-1</sup> erreichbar ist.

### Sekundäres Abwasser: AnMBR Effluent

Bei dem sogenannten AnMBR Effluent handelt es sich um ein in einem anaeroben Membran-Bioreaktorsystem (AnMBR) der Ben-Gurion-Universität in Be'er Scheva, Israel vorbehandeltes, reales sekundäres Abwasser. In einem Membranbioreaktor fand eine Reduktion der C-Quellen eines realen Abwassers einer Lebensmittelfabrik in Israel statt. Für den Transport nach Deutschland wurde das so entstandene sekundäre Abwasser lyophilisiert und als Pulver ver-

schickt, welches im Anschluss als Medium zur Algenkultivierung vorbereitet wurde. Hierfür wurde das Pulver in Reinstwasser gelöst (1 g pro 1 L) und wie folgt supplementiert: Um den Verlust an Stickstoff während des Lyophilisierens auszugleichen, wurde die Ziel-Stickstoffkonzentration von  $150 \text{ g}_N \cdot \text{L}^{-1}$  durch die Zugabe von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  eingestellt. Zudem wurden eine A5 Mikronährstofflösung sowie eine Fe-EDTA-Lösung (Zusammensetzung siehe Tabelle 8-5 sowie Tabelle 8-6 im Anhang) zugefügt. Zur Pufferung des pH-Wertes wurde  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ( $0,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) eingesetzt.

#### Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)

Die Bäckerhefe wurde für Filtrationsexperimente in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS), einem für Zellen nicht-toxischem Puffer, gelöst ( $\text{NaCl}$   $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{KCl}$   $0,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $1,44 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   $0,24 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 7,4; nach Sambrook und Russell 2001. Aufgrund des Ionengehalts der Salzlösung schützt PBS die Zellen vor zu hohem osmotischem Druck.

## **2.3 Stammhaltung und Kultivierung in Schüttelkolben**

Die notwendigen Arbeiten der Stammhaltung und Schüttelkolbenkultivierung wurden unter Zuhilfenahme steriler Materialien aseptisch unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. Die beimpften Kolben wurden anschließend in einem Brutschrank auf einem institutsintern modifizierten Schüttler, welcher mit Leuchtdioden ausgestattet wurde, inkubiert. Alle zur Durchführung benötigten Materialien und Geräte sind mit den entsprechenden Spezifikationen im Anhang in Tabelle 8-7 und Tabelle 8-8 aufgelistet.

### **2.3.1 Stammhaltung**

Die verwendeten Algenkulturen wurden als Flüssigkulturen (Stammhaltung) in Schüttelkolben (500 mL Weithalskolben mit Cellulose-Stopfen) kultiviert (pH 7,5,  $22 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 100 rpm, passive Begasung). Zur Langzeiterhaltung der Algenbiomasse ohne Überalterung der Kultur wurde im Rhythmus von zwei Wochen ein Aliquot der bestehenden Kultur (1-3 mL) in frisches BB-Medium (200 mL) überführt. Außerdem diente die Stammhaltung als Inokulum für Kultivierungsexperimente in Schüttelkolben (siehe Kapitel 2.3.2) sowie als Ausgangsmaterial zur Vorbereitung des Inokulums für Kultivierungsversuche im Photobioreaktor (Kapitel 2.5).

### **2.3.2 Kultivierung in Schüttelkolben**

Die Kultivierung in Schüttelkolben fand in der vorliegenden Arbeit für folgende Zwecke statt:

#### Inokulum für Kultivierungsversuche im Photobioreaktor

Das Inokulum für Kultivierungsexperimente im Photobioreaktor wurde in 500 mL-Weithals-Erlenmeyerkolben mit Cellulose-Stopfen angesetzt. Hierfür wurde zu 250 mL Medium (pH 7,5)

circa 20 mL der Flüssigkultur aus der Stammhaltung gegeben und für 96 h bei 22 °C, 100 rpm, 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  und passiver Begasung mit Raumluft kultiviert.

### Bereitstellung von Mikroalgen-Biomasse für Filtrationsexperimente

Um Algenbiomasse für Filtrationsexperimente im *Mini-Harvester* (siehe Kapitel 3.1.2) zu erzeugen, wurden bewegte, begasbare Weithals-Erlenmeyerkolben (Volumen 1 L) eingesetzt (siehe Abbildung 2-4). Als Inokulum diente die Kultur der Stammhaltung, es wurden circa 40 mL Algensuspension in 600 mL BB-Medium (pH 7,5) resuspendiert. Die Kultivierung fand bei 22 °C, 100 rpm, 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  und einer Begasungsrate von 0,1 vvm (90 % (v/v) O<sub>2</sub>, 10 % (v/v) CO<sub>2</sub> in Zuluft) für 4-6 Tage statt. Um die Bereitstellung einer möglichst dichten Algenkultur zu erreichen, wurde die Lichtintensität nach 48 h auf 400  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  erhöht. Vor dem Einsatz für Filtrationsexperimente (Kapitel 3.3.1) wurde die Biomasse bezüglich optischer Dichte und Biotrockenmasse charakterisiert (siehe Kapitel 2.4.2). Bei Bedarf wurde den Schüttelkolben unter der Sterilwerkbank aseptisch ein Aliquot zur weiteren Analyse (siehe Kapitel 2.4) entnommen, wobei das Probevolumen maximal 10 % des Kolbeninhaltes betrug.



Abbildung 2-4: Begaste Weithals-Erlenmeyerkolben zur Mikroalgenkultivierung auf einem beleuchteten Schüttler. Quelle: eigene Aufnahmen.

## 2.4 Analytik

Alle zur Durchführung der Analytik benötigten Materialien und Geräte sind mit den entsprechenden Spezifikationen im Anhang in Tabelle 8-7 und Tabelle 8-8 aufgelistet.

Zellhaltige Proben aus Schüttelkolben oder Photobioreaktor wurden hinsichtlich einer Vielzahl von Parametern untersucht, welche im Folgenden beschrieben sind. Ein Aliquot der Proben wurde direkt zur Quantifizierung der Biomassekonzentration (Kapitel 2.4.2) sowie zur Mikroskopie (Kapitel 2.4.4) eingesetzt. Die verbleibende Probe wird zu je 1 mL in Eppendorf Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei 11.000 rpm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vereint und direkt zur Analyse der Medienzusammensetzung (Kapitel 2.4.1) eingesetzt. Das Zellpellet wird bei -18 °C eingefroren und vor der Bestimmung der makromolekularen Zusammensetzung (Kapitel 2.4.3) aufgetaut. Jede Zellprobe der vorliegenden Arbeit durchlief zur Gewährleistung der Homogenität genau einen dieser sogenannten *freeze-thaw*-Zyklen.

Algenbiomasse aus Kultivierungsexperimenten im Photobioreaktor wurde für eine detailreichere Analytik (Kapitel 2.4.3.4 und 2.4.3.5) an ein externes Labor (Bioanalytik Labor des Kompe-

tenzzentrum Algenbiotechnologie der Hochschule Anhalt) geschickt. Hierfür wurde ein Aliquot von ~50 mL Kulturbrühe zentrifugiert (4500 rpm, 4 °C, 30 Min), der Überstand abgenommen und das Zellpellet im Anschluss in einem Gefriertrockner getrocknet.

## 2.4.1 Medienzusammensetzung

### 2.4.1.1 Reflektometer

Eine schnelle, prozessbegleitende Analyse des Ammonium- ( $\text{NH}_4^+$ ) und Phosphatgehaltes ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) des Mediums im Laufe einer Mikroalgenkultivierung fand mittels eines sogenannten Reflektometers inklusive der zugehörigen Teststäbchen statt. Hierbei wurde das frische Mediums sowie der zellfreie Überstand einer Reaktorprobe nach Zentrifugation nach einer Verdünnung (mind. 1:2 (v/v)) mit Reinstwasser (Widerstand  $\geq 16 \text{ M}\Omega$  bei RT) entsprechend der vom Hersteller angegebenen Vorgehensweise analysiert.

### 2.4.1.2 Ionenchromatographie

Mittels der Ionenaustauschchromatographie (kurz Ionenchromatographie, IC) fand ein Nachweis der anorganischen Ionen im Überstand der zentrifugierten Reaktorproben sowie des frischen Kulturmediums statt. Einsatz fand ein Ionenchromatograph mit automatischer Probenvorlage (Spezifikationen siehe Tabelle 8-8 im Anhang). Tabelle 2-2 fasst die analysierten Ionen, eingesetzten Säulen sowie die Zusammensetzung der Eluenten der Kationen- sowie der Anionen-Austausch-Chromatographie zusammen. Eine Quantifizierung der Chromatographie-Peaks fand mit sieben (Kationen) beziehungsweise fünf (Anionen) Standards bekannter Konzentration statt. Für die Herstellung der Eluenten und Standards sowie zur Verdünnung der Proben (standardmäßig im Verhältnis 1:5 (v/v) oder 1:10 (v/v)) wurde Reinstwasser (Widerstand  $\geq 16 \text{ M}\Omega$  bei RT) verwendet.

Tabelle 2-2: Übersicht der analysierten Ionen, verwendeten Säulen und Zusammensetzung des Eluenten für die Anionen- sowie Kationenaustauschchromatographie.

	<b>Anionen</b>	<b>Kationen</b>
<i>Analysierte Ionen</i>	Phosphat ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ), Chlorid ( $\text{Cl}^-$ ), Sulfat ( $\text{SO}_4^{2-}$ )	Natrium ( $\text{Na}^+$ ), Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), Kalium ( $\text{K}^+$ ), Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) Magnesium ( $\text{Mg}^{2+}$ )
<i>Säulen</i>	Metrosep A Supp 4/5 Guard 4.0 (Vorsäule) Metrosep A Supp 5-150/4.0	Metrosep C 4 150/4.0 (Vorsäule) Metrosep C 4 S-Guard
<i>Eluent</i>	3,2 mM Natriumcarbonat, 1 mM Natriumhydrogencarbonat, 12,5 % (v/v) Acetonitril	1,7 mM Salpetersäure, 0,7 mM Dipicolinsäure

## 2.4.2 Biomassequantifizierung

### 2.4.2.1 Biotrockenmasse

Die Biomassekonzentration (in  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) wurde als sogenannte Biotrockenmasse (BTM) gravimetrisch ermittelt, welche die Konzentration in Gramm trockener Biomasse pro L Zellsuspension wiedergibt. Hierfür wurde zunächst ein definiertes Volumen  $V_{\text{Probe}}$  auf zuvor mit Reinstwasser gewaschene und mit einer Analysewaage gewogene Glasfaserfilter ( $0,7\ \mu\text{m}$ ) aufgetragen, mittels Unterdrucks filtriert und anschließend nochmals mit Reinstwasser gewaschen. Die Filter wurden folgend für 48 h in einem Trockenschrank bei  $80\ ^\circ\text{C}$  getrocknet und nach abkühlen in einem Exsikkator (mindestens 2 h) erneut gewogen ( $m_{\text{leer+Zellen}}$ ). Die Masse der aufgetragenen Probe entspricht der Differenz aus  $m_{\text{leer+Zellen}}$  sowie des Leergewichts des Filters ( $m_{\text{leer}}$ ). Die Biomassekonzentration kann nach Gleichung (2.1) ermittelt werden. Die Bestimmung erfolgte in Triplikaten.

$$c_{\text{BTM}} = \frac{m_{\text{leer+Zellen}} - m_{\text{leer}}}{V_{\text{Probe}}} \quad (2.1)$$

### 2.4.2.2 Optische Dichte

Parallel zur Bestimmung der Biotrockenmasse fand eine Quantifizierung der Biomassekonzentration über die optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 750 nm (Algen,  $\text{OD}_{750}$ ) beziehungsweise 500 nm (Hefe,  $\text{OD}_{500}$ ) mittels eines Spektralphotometers (Spaltbreite 1 nm) statt. Für den Nullabgleich sowie zur Verdünnung der Proben (ab einer Extinktion von 0,4) diente Reinstwasser.

## 2.4.3 Biomassezusammensetzung

### 2.4.3.1 Gesamtpolysaccharidgehalt

Eine Quantifizierung des Gehaltes an Gesamtpolysacchariden einer Zellprobe fand mittels der sogenannten Anthron-Methode nach YEMM und WILLIS 1954 statt. Das tricyclische Molekül Anthron bildet dabei mit zuvor hydrolysierten Monosacchariden eine Farbreaktion, welche bei einer Wellenlänge von 625 nm ( $\text{OD}_{625}$ ) in einem Spektralphotometer (Spaltbreite 1 nm) nachgewiesen werden kann. Mittels einer Kalibriergerade mit Stärke nach Zulkowsky (in Reinstwasser gelöst (Widerstand  $\geq 16\ \text{M}\Omega$  bei RT), Konzentration von 20 bis  $400\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) kann im Anschluss der Polysaccharidgehalt einer Probe berechnet werden.

Zum Zellaufschluss (exotherm) wurde ein definiertes Volumen an Anthron-Reagenz ( $800\ \mu\text{L}$ ,  $1\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  Anthron in konzentrierter Schwefelsäure ( $> 95\ \%$ ) auf eine zellhaltige Probe im Eisbad gegeben. Zuvor wurde das Zellpellett mit Reinstwasser zu einem Volumen von  $400\ \mu\text{L}$  resuspendiert. Die darauffolgende Inkubation (16 min, 300 rpm,  $95\ ^\circ\text{C}$ ) diente der Hydrolyse der zellulären Polysaccharide zu Monosacchariden, wodurch die Farbreaktion mit Anthron eingeleitet wurde. Nach dem Abstoppen der Reaktion durch Abkühlen im Eisbad wurde letztere durch Messung der  $\text{OD}_{625}$  im Photometer (Spaltbreite 1 nm) nachgewiesen und über die Kalibriergerade quantifiziert. Für jede Probe erfolgte die Messung der Gesamtkohlehydrate im Triplikat.

### 2.4.3.2 Proteingehalt

Die Ermittlung des Proteingehaltes einer lysierten Algenzellprobe fand nach (Lowry et al. 1951) im Triplikat mit dem Nachweisreagenz Folin statt. Dieses reagiert in alkalischer Umgebung mit Aminen zu einem fluoreszenten Farbstoff, welcher photometrisch bei einer Wellenlänge von 750 nm nachgewiesen werden kann. Mittels einer Kalibriergerade mit Bovinem Serumalbumin (BSA) (Konzentration von 0 bis 300 mg·L<sup>-1</sup>) kann im Anschluss der Proteingehalt einer Probe berechnet werden.

Der hierfür notwendige Schritt des Zellaufschlusses fand in der Kugelmühle (10 Min, 30 Hz) statt. Die gefrorenen Pellets einer zellhaltigen Probe wurden zuvor durch Zugabe von Glaskugeln (1,5 mL, Ø 0,25-0,5 mm) sowie 450 µl Reinstwasser vorbereitet. Zur Proteinextraktion wurde folgend 500 µL Lysepuffer (4 % w/v Natriumdodecylsulfat (SDS), 0,12 M TRIS) zugegeben und im Thermoinkubator für 10 Min bei 90 °C ohne Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Glaskugeln abzentrifugiert, 200 µL des Überstands entnommen und mit Reinstwasser auf 1 mL aufgefüllt. Bei Bedarf fand eine geeignete Verdünnung der jeweiligen Proben sowie ein Abzentrifugieren von Zellbruchstücken (20 °C, 11.000 rpm, 10 Min) statt. Zur Quantifizierung der Proteinkonzentration wurden 950 µL der zellfreien Lösung mit 1 mL Lowry-Reagenz inkubiert (20 Min, RT, im Dunkeln). Die Lösung wurde mit 500 µL Folin-Reagenz erneut inkubiert (30 Min, RT, im Dunkeln) und anschließend die Absorption bei 750 nm in einem Spektralphotometer (Spaltbreite 1 nm) gemessen.

Ein reduzierender Effekt des TRIS auf die Proteinkonzentration konnte aufgrund der ausreichend hohen Probenverdünnung (> 1:10 (v/v)) ausgeschlossen werden.

### 2.4.3.3 Pigmentgehalt

Der Gehalt an Chlorophyll a (Chl<sub>a</sub>), Chlorophyll b (Chl<sub>b</sub>) sowie Carotinoiden (Car<sub>x+c</sub>) der Algenzellproben wurde spektralphotometrisch im Triplikat quantifiziert. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Pigmente erfolgten alle Arbeiten soweit möglich unter Lichtausschluss.

Die Extraktion der Pigmente aus dem Zellpellet fand durch die Zugabe von Dimethylsulfoxid (DMSO, 90 % (v/v)) mit anschließender Inkubation (20 Min, 45 °C, 600 rpm) in einem Thermoschüttler statt. Nach anschließender Zentrifugation (10 Min, 11000 rpm, 20 °C) erfolgte die photometrische Messung der Absorption (Abs) (Spaltbreite 1 nm) des Überstandes bei 750, 665, 649 und 480 nm. Die Ermittlung der Pigmentkonzentrationen erfolgte über die Gleichungen (2.2) bis (2.4) nach Wellburn 1994. Als Blindkontrolle sowie zur Verdünnung der Proben bei Absorptionswerten über 0,9 diente DMSO.

$$\text{Chl}_a = 12,19 \cdot \text{Abs}_{665} - 3,45 \cdot \text{Abs}_{649} \quad (2.2)$$

$$\text{Chl}_b = 21,99 \cdot \text{Abs}_{649} - 5,32 \cdot \text{Abs}_{665} \quad (2.3)$$

$$\text{Car}_{x+c} = \frac{1000 \cdot \text{Abs}_{480} - 2,14 \cdot \text{Chl}_a - 70,16 \cdot \text{Chl}_b}{220} \quad (2.4)$$

#### **2.4.3.4 Lipidgehalt**

Der Gesamtlipidgehalt der Algenzellen wurde gravimetrisch nach einer Extraktion mittels eines Gemisches aus Chloroform und Methanol (2:1 (v/v)) in einem externen Analyiselabor (Bioanalytik Labor des Kompetenzzentrum Algenbiotechnologie der Hochschule Anhalt) bestimmt.

#### **2.4.3.5 Elementaranalytik**

Für die Analyse des Gehaltes an Kohlenstoff (C), Stickstoff (N), Schwefel (S) und Wasserstoff (H) der Algenzellen wurden 2-4 mg trockene Biomasse in einem Elementaranalysator (Vario Micro Cube, Elementar, Deutschland; Referenzmessung: Sulfanilamid) in einem externen Analyiselabor (Bioanalytik Labor des Kompetenzzentrum Algenbiotechnologie der Hochschule Anhalt) untersucht.

#### **2.4.4 Mikroskopie**

Aussehen, Form, Größe und Vitalität der eingesetzten Mikroorganismen wurde mittels eines Lichtmikroskops mit dem dazugehörigen Programm (Microscope VIS) bewertet. Zur Dokumentation wurden Fotos mittels einer angeschlossenen Kamera in verschiedenen Maßstäben angefertigt. Die Analyse der Zellgröße der Mikroskopieaufnahmen fand mittels des lizenzfreien Bildbearbeitungsprogrammes ImageJ statt.

### **2.5 Kultivierungssystem *BioEngineering***

Die Spezifikationen des Photobioreaktorsystems inklusive der Erweiterungen sind im Anhang in Tabelle 8-9 und Tabelle 8-11 aufgelistet.

#### **2.5.1 Aufbau und Ausstattung des Photobioreaktorsystems**

Das für Mikroalgen Kultivierungsexperimente im Labormaßstab eingesetzte Reaktorsystem ist ein 2 L Bioreaktor der Firma BioEngineering AG (Modell KLF 2000). Institutsintern wurde ein aus zwei Halbschalen bestehendes Lichtmodul mit Kollimatorlinsen (6° Abstrahlwinkel) entworfen, welches eine optimale Beleuchtung des gesamten zylindrischen Kulturvolumens erlaubt (Jacobi et al. 2012).

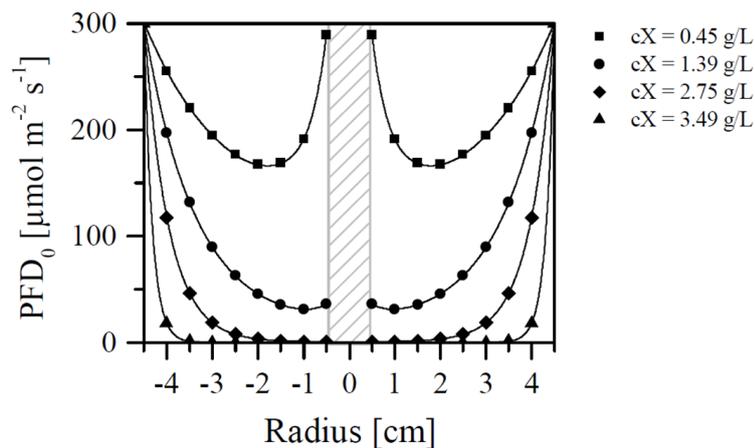


Abbildung 2-5: Lichtprofil der Grünalge *Chlorella vulgaris* im Photobioreaktor Systems *BioEngineering* entlang des Reaktordurchmessers für verschiedene Biomassekonzentrationen (hier: cX). Die grau schraffierte Fläche repräsentiert die Rührwelle des Reaktors. (Trautmann 2018)

Aus vorhergehenden Arbeiten am Institut ist bekannt, dass die zylindrische Geometrie des Reaktors bei mittleren bis geringen Biomassekonzentrationen (im Bild: cX) eine Fokussierung der eingestrahnten Photonen zur Mitte hin verursacht (Abbildung 2-5), welche die gegenseitige Abschattung der Zellen nahezu kompensiert. Bei dichten Kulturen ( $cX \geq 2,75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) kommt es zu einer vollständigen Aufnahme der eingestrahnten Photonen bereits nahe des Reaktor-Randes. (Trautmann 2018). Die homogene Durchmischung im Photobioreaktor sorgt dennoch für eine gleichmäßige Lichtversorgung aller vorhandener Zellen.

Der Reaktor selbst besteht aus einem zylindrischen Glaskörper mit einem Volumen von 2 L (Arbeitsvolumen 1,58 L), welcher mit einer Boden- sowie einer Deckelplatte aus Edelstahl verschlossen wird. Zudem ist dieser mit verschiedenen Sensoren zur umfangreichen Online-Analytik ausgestattet. Der Aufbau des Photobioreaktors ist flexibel an das jeweilige Experiment anpassbar. Im Folgenden sind die verschiedenen Konfigurationen beschrieben, in welchen das System für die Versuche der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurde. Der automatisierte Betrieb des Reaktors sowie die kontinuierliche Datenaufzeichnung der online gemessenen Parameter erfolgte über das am Institut entwickelte Prozessleitsystem BioProCon, welches auf dem grafischen Programmiersystem LabVIEW basiert. Die Kommunikation zwischen BioProCon und den entsprechenden Geräten erfolgte über die speicherprogrammierbare Steuerung SIMATIC S7-300. Auch BioProCon kann an die jeweiligen experimentellen Aufbauten angepasst werden. Die Weiterentwicklung der automatischen Regelung zum Betrieb des Algen-Membran-Photobioreaktors (Kapitel 2.5.4) war Gegenstand dieser Arbeit und ist in Kapitel 3.1.2 im Detail beschrieben.

## 2.5.2 Satzbetrieb

Die Kultivierung im Satzbetrieb (auch Batchbetrieb) stellt den einfachsten Aufbau des Reaktor-Systems dar (Abbildung 2-6). Die weiteren Konfigurationen, welche in den folgenden Kapiteln vorgestellt werden, sind lediglich Erweiterungen dieses „Grund“-Systems.

Der zylindrische Glaskörper des Photobioreaktors wurde von einem Lichtmodul umschlossen (Abbildung 2-6 (A)). Eine ideale Durchmischung des Reaktorinhaltes wurde durch einen motorbetriebenen Scheibenblattrührer (Drehzahl: 250 rpm, Abbildung 2-6 (B)) sowie den Einsatz eines Strombrechers realisiert. Die Temperierung des Reaktorinhaltes erfolgte automatisiert: Ein Temperatursensor (Typ Pt100) am Reaktorboden (Abbildung 2-6 (E)) sendete den Ist-Wert an den Steuerschrank, woraufhin durch die jeweilige An-/Abschaltung des Heizstabes beziehungsweise der Kühlwasser-Zufuhr (Reaktorboden, Abbildung 2-6 (C) und (D)) die gewünschte Temperatur eingestellt wurde. Die pH-Wert Messung im Reaktorinhalt erfolgte mittels einer potentiometrischen Sonde am Reaktordeckel (Abbildung 2-6 (E)), der gewünschte Sollwert wurde automatisiert durch das Zu-Pumpen von Stellmittel (Base: 1 M NaOH, Abbildung 2-6 (K)) reguliert. Der sterile Gasaustausch zwischen Stellmittel-Vorratsflasche und Umgebung wurde durch das Anbringen von PTFE-Sterilfilter (0,2  $\mu\text{m}$  Porendurchmesser) ermöglicht. Die Beleuchtung erfolgte mittels eines Lichtmoduls (Abbildung 2-6 (A)). Die gewünschte Photonflussdichte wurde über die Stromstärke eines Netzteils bei konstanter Spannung eingestellt. Die Kalibration des Lichtmoduls erfolgte mittels eines planaren Lichtsensors. Der Gaseintrag sowie die -verteilung wurde über einen Sparger realisiert, welcher der homogenen Dispersion der Zuluft im Reaktor dient. Die Zuluft-Zufuhr (95  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $\text{CO}_2$ -Anteil 5 % (v/v)) am Reaktordeckel wurde über Massflowcontroller (MFC) geregelt und vor dem Eindringen in den Reaktor befeuchtet. Eine Kalibration der MFCs fand vor jedem Experiment mithilfe eines Seifenblasen-Durchflussmessers statt. Die Abluft wurde am Kopf des Reaktors abgenommen und dessen Zusammensetzung nach dem Passieren einer Abgasfalle mittels eines Mairhak-Systems auf den Gehalt an Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid circa alle 60 min analysiert. Zudem wurde der Sauerstoffpartialdruck ( $p\text{O}_2$ ) des Reaktorinhaltes von einer Sonde am Deckel (Abbildung 2-6 A (E)) gemessen. Eine online Quantifizierung der Biomassekonzentration (optische Dichte) erfolgte durch eine Sonde am Reaktorboden (Abbildung 2-6 (E)) nach externer Kalibration (Messung der BTM, siehe Kapitel 2.4.2.1). Das Messsystem bestand aus einer Lichtquelle sowie einem Detektor, welche die optische Dichte im Kulturmedium bei verschiedenen Wellenlängen misst. Das Probenahmesystem (Glasfläschchen) am Reaktorboden (Abbildung 2-6 (N)) erlaubte die sterile Entnahme eines Reaktor-Aliquots zur offline Analytik. Die Verarbeitung der Reaktorproben ist in Kapitel 2.4 beschrieben.

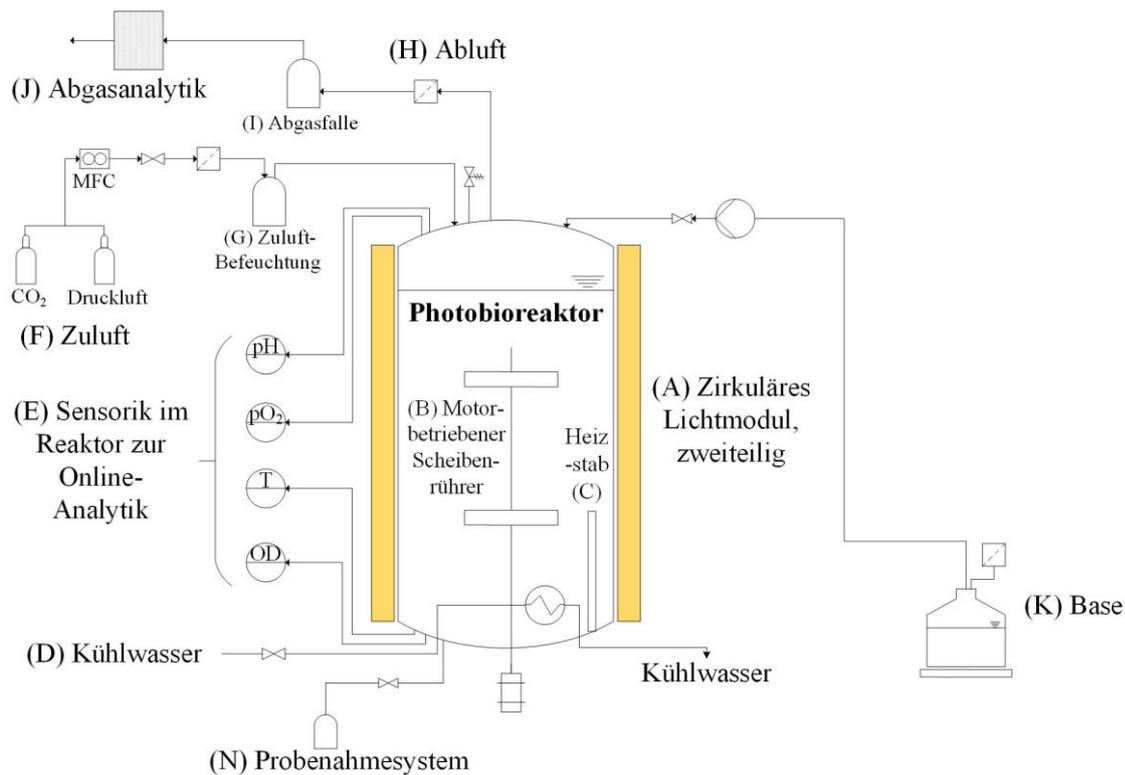
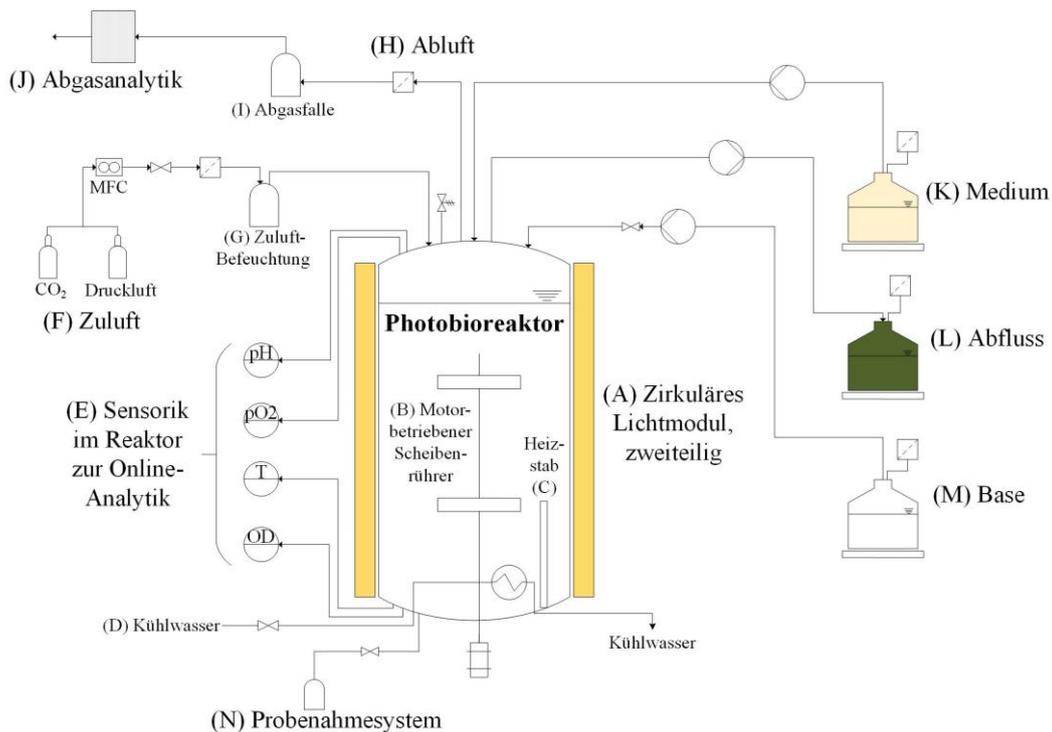


Abbildung 2-6: Schema des Photobioreaktor Systems BioEngineering, welches für Kultivierungsexperimente im Labormaßstab eingesetzt wurde. Der gezeigte Aufbau erlaubt eine Kultivierung im Satz-Betrieb. Quellen: Eigene Zeichnung.

Eine Satzkultivierung von *Chlorella vulgaris* SAG211-12 in Bold Basal Medium (Kapitel 0) fand bei pH 7,5, 25 °C und einer Lichtintensität von  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (24 h Licht) statt. Die erzeugte Biomasse war Ausgangsmaterial für die Untersuchung des Einflusses der Wachstumsphase der Mikroalgen auf das Membran-Fouling in Kapitel 3.4.1.

### 2.5.3 Kontinuierliche Kultivierung

Grundlage für die kontinuierliche Kultivierung im BioEngineering-System ist der im vorhergehenden Abschnitt beschriebene Aufbau zur Satzkultivierung, welcher an dieser Stelle nicht noch einmal wiederholt wird. Das PBR-System wurde lediglich erweitert, es fanden keine reduzierenden Veränderungen statt. Sofern nicht explizit anders deklariert, wurden die Kultivierungsbedingungen bezüglich Rührerdrehzahl, pH-Wert und Stellmittel sowie Begasungsrate und Gaszusammensetzungen übernommen. Zur Realisierung von kontinuierlichen Kultivierungen wurden Vorratsbehälter für den Zufluss frischen Mediums in bzw. den Abfluss von Kulturbrühe aus dem PBR über Peristaltikpumpen an den Reaktor gekoppelt (Abbildung 2-7 (K) und (L)). Die Ermittlung der ein- und austretenden Volumenströme erfolgte per Wägung. Alle Kultivierungen wurden bei konstantem Reaktorvolumen durchgeführt, wobei eine konstante Verdünnungsrate  $D$  für jedes Experiment vorgegeben wurde.



A



B

Abbildung 2-7: Photobioreaktor System BioEngineering, welches für Kultivierungsexperimente im Labormaßstab eingesetzt wurde. Obiger Aufbau erlaubt eine Kultivierung im kontinuierlichen Betrieb. (A) Schematischer Aufbau, (B) Fotografie. Quellen: Eigene Aufnahme und Zeichnung.

Die kontinuierliche Kultivierung von *Chlorella vulgaris* SAG211-12 fand in modifiziertem BG11-Medium (Kapitel 0) bei pH 7,5, 25 °C und  $350 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  bei einem Hell/Dunkel-Regime von 16 h Licht/8 h Dunkelheit statt. Die vorgegebenen Verdünnungsraten während der Lichtperioden  $D_{\text{Tag}}$  deckten den Bereich zwischen  $D=0,0 \text{ d}^{-1}$  und  $D=1,0 \text{ d}^{-1}$  in  $0,1 \text{ d}^{-1}$ -Schritten ab. Die Verdünnungsrate  $D_{\text{Nacht}}$  der jeweiligen Dunkelphase betrug  $0,1\cdot D_{\text{Tag}}$ . Der experimentelle Aufbau diente der Optimierung der Nährstoffaufnahme bei kontinuierlichen Mikroalgenkulti-

vierungen mit Tag/Nacht-Zyklen und variablen Durchflussraten, siehe Kapitel 4.1. Der kontinuierlichen Kultivierung ging eine Satzphase voraus. Nach dem Erreichen der stationären Phase der Wachstumskurve ( $c_{BM} \approx$  konstant für zwei Tage), wurde der Reaktor beprobt und als Durchflussrate  $D_{Tag} = 0,0 \text{ d}^{-1}$  definiert. Im Anschluss wurde der kontinuierliche Betrieb gestartet. Die kontinuierliche Kultivierung bei einer spezifischen Durchflussrate fand für mindestens eine Woche bei konstanten Parametern (Lichtintensität und -regime, pH, Temperatur, Begasungsrate und Gaszusammensetzung, Medienzusammensetzung) statt, wobei die Prozessparameter  $pO_2$ , optische Dichte und Abgaszusammensetzung auf ihre Konstanz und Reproduzierbarkeit hin überprüft wurden. Wurde ein Gleichgewichtszustand erreicht, erfolgte die Probenahme von insgesamt sechs Aliquoten. Die Beprobung des Reaktors erfolgte nach einem festgelegten Zeitschema: Jeweils (0) 0,5 h vor, (1) 0,5 h nach, (2) 2 h nach, (3) 4 h nach, (4) 6 h nach und (5) 7,5 h nach Beginn der Nachtphase. Im Anschluss an die Probenahme wurde die Durchflussrate jeweils um  $0,1 \text{ d}^{-1}$  erhöht.

Im Anschluss an den beschriebenen Versuchsablauf wurde eine weitere kontinuierlichen Kultivierung bei einer Durchflussrate  $D_{Hell}$  von  $0,4 \text{ d}^{-1}$  durchgeführt, wobei die Lichtintensität bei ansonsten gleichen auf  $1050 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  erhöht wurde, um eine Lichtlimitierung der Mikroalgenzellen auszuschließen. Zu Beginn der Nachtphase erfolgt zudem die Zugabe von 50 mL einer Ammoniumstickstoff-Stocklösung einer Konzentration von  $c_N = 5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  wodurch eine N-Konzentration  $c_{N,PBR}$  von  $\sim 200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  im Reaktor herrschte.

## 2.5.4 Algen Membran-Photobioreaktor

Eine Erweiterung des beschriebenen Photobioreaktor-Systems aus Abbildung 2-7 zur kontinuierlichen Mikroalgenkultivierung um eine externe Filtrationseinheit (*Mini-Harvester*) resultiert in einem sogenannten Membran-Photobioreaktor (MPBR, siehe Abbildung 2-8). Der aus dem Reaktor austretende Volumenstrom wurde nicht in einem Vorratsgefäß gesammelt, sondern in den *Mini-Harvester* (Abbildung 2-8 (L)) eingebracht. Entlang der Membran fand die fest-flüssig Trennung statt, der zellfreie Permeat-Volumenstrom (Abbildung 2-8 (O)) wurde mittels Wägung quantifiziert. Die aufkonzentrierte Algensuspension (Retentat) konnte in den PBR zurückgeführt und/oder in einem separaten Gefäß (Abbildung 2-8 (P)) als Ernte gesammelt und via Wägung quantifiziert werden. Der Aufbau ermöglichte dementsprechend einen kontinuierlichen Betrieb mit und ohne Zellrückführung. Aus praktischen Gründen fand für den Aufbau als MPBR eine Mehrkanalpumpe Einsatz, welche das in den PBR zugeführte Medium, den *Mini-Harvester* Zufluss aus dem PBR, den Rückfluss von *Mini-Harvester* in den PBR sowie das Retentat transportierte. Die Konzeption des *Mini-Harvesters* war Gegenstand der vorliegenden Arbeit, sämtliche Geräte-Spezifikationen, Betriebsweisen und Funktionen sind im Folgenden in Kapitel 3.1.2 detailliert erläutert.

Die kontinuierliche Kultivierung im MPBR von *Chlorella vulgaris* SAG211-12 mit Zellrückführung fand in modifiziertem BG11-Medium (Kapitel 2.2) bei pH 7,5,  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $350 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  bei kontinuierlicher Beleuchtung (Versuchsreihe I) bzw. einem Hell/Dunkel-Regime von 16 h Licht/8 h Dunkelheit (Versuchsreihe II) statt. Tabelle 2-3 fasst die angewandten Parameter der drei durchgeführten Versuchsreihen zusammen. Der experimentelle Aufbau diente der

Untersuchung der makromolekularen Biomassezusammensetzung sowie Nährstoffaufnahme bei Zellrückführung (Kapitel 5.2.1).

Tabelle 2-3: Parameter (Verdünnungsrate und Rückführverhältnis) der drei Versuchsreihen unter Einsatz des MPBR-Systems. Für die Versuche wurde *Chlorella vulgaris* SAG 211-12 in mBG11-Medium bei pH 7,5, 25 °C,  $350 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  mit und ohne Hell/Dunkel-Regime (16 h:8 h) kontinuierlich kultiviert.

Versuchsreihe	Lichtregime	$D_{\text{Hell}}$ in $\text{d}^{-1}$	$D_{\text{Dunkel}}$ in $\text{d}^{-1}$	$v_{\text{Hell}}$	$v_{\text{Dunkel}}$	Membranfläche in $\text{m}^2$
I	Permanente Beleuchtung	0,4 0,5	--	1,4	--	0,001772
II	16 h Hell 8 h Dunkel	1,0	1,0	0,0 3,0	3,0 3,0	0,00686
III	16 h Hell 8 h Dunkel	0,3	0,3	--	1,0	0,001772

Aufgrund der hohen Leistungsfähigkeit der Membran sowie der Ausstattung des MPBR-Systems musste zur Realisierung geringer Filtrat-Fluxe eine Reduzierung der Membranfläche durch ein Kürzen der Membranfasern erfolgen. Insgesamt standen drei Faserhalter zur Verfügung, welche verschiedene Flux-Bereiche abdeckten (siehe Abschnitt 8.3.4).

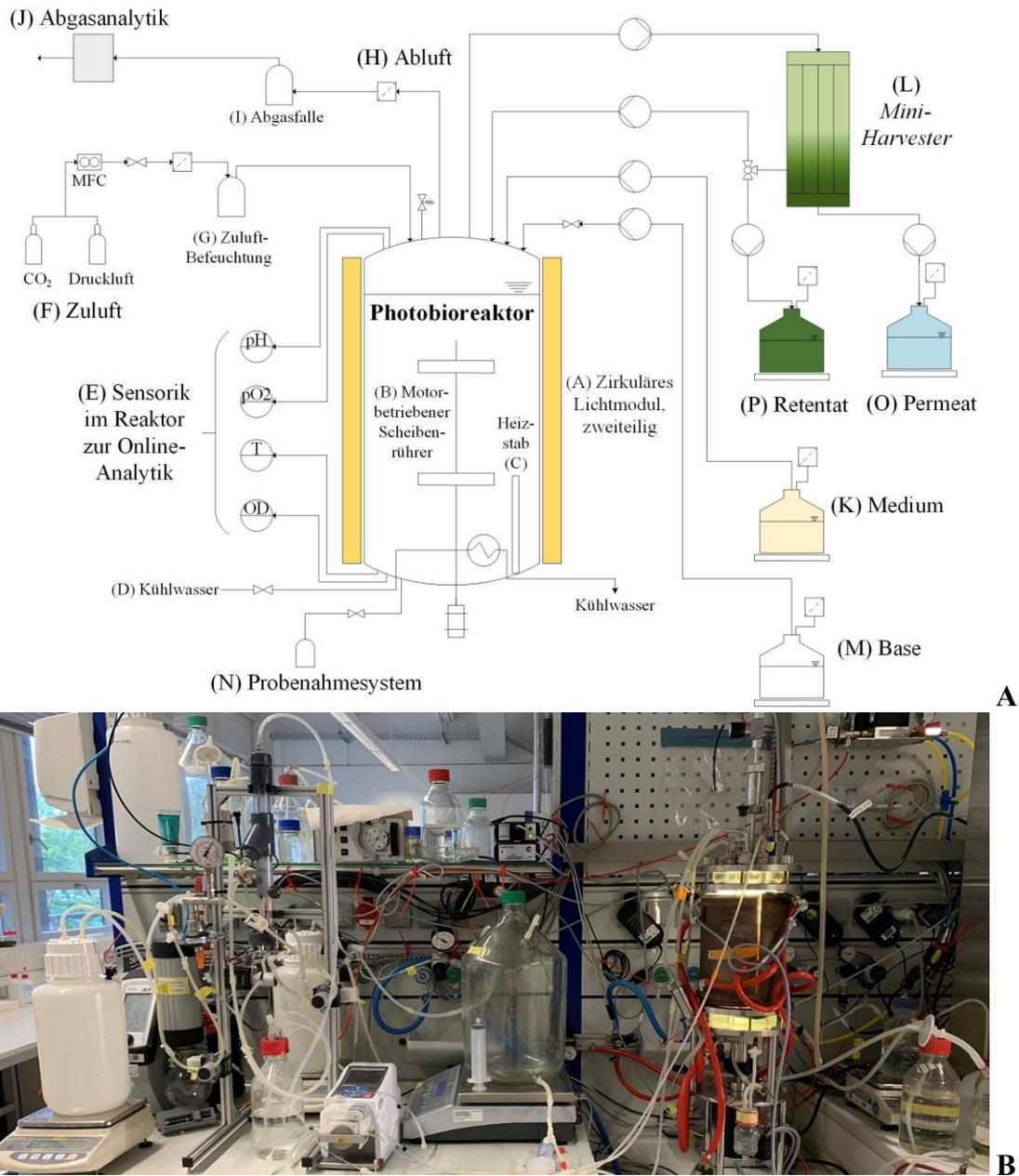


Abbildung 2-8: Membran-Photobioreaktor System BioEngineering mit externer Filtrationseinheit *Mini-Harvester*, welches für Kultivierungsexperimente im Labormaßstab eingesetzt wurde. Obiger Aufbau erlaubt eine Kultivierung im kontinuierlichen Betrieb mit Zellrückführung. (A) Schematischer Aufbau, (B) Fotografie. Quellen: Eigene Aufnahme und Zeichnung.

## 2.6 Berechnungen

### 2.6.1 Biomasse Zusammensetzung

Die in Kapitel 2.4.3 beschriebenen Analysemethoden liefern als Ergebnis die Konzentration des jeweiligen Makromoleküls (Proteine, Kohlehydrate, Pigmente gemessen als Chlorophyll) in der Einheit  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , welche im eingesetzten Reaktionsgefäß messbar war. Unter Berücksichtigung der Biomassekonzentration  $c_{\text{BM}}$  kann der Gehalt  $q_{\text{Mm}}$  eines Makromoleküls Mm nach Gleichung (2.5) bestimmt werden. Dabei entspricht  $c_{\text{Mm}}$  der Konzentration des jeweiligen Makromoleküls Mm.

$$q_{\text{Mm}} = \frac{c_{\text{Mm}}}{c_{\text{BM}}} \quad (2.5)$$

Der Gehalt an Nukleinsäuren wird als 10 % des gemessenen Proteingehaltes angenommen (Gleichung (2.6)).

$$q_{\text{Nukleinsäuren}} = 10 \% \cdot q_{\text{Protein}} \quad (2.6)$$

Die Gehalte aller genannten Makromoleküle der Biotrockenmasse addieren sich aufgrund der Messungenauigkeiten der einzelnen Analysemethoden zu einem Wert von  $\sim 1,10$ . Die gemessenen Anteile wurden daher einer Normierung zu einer Summe von 1 unterzogen und die so erzeugten, umgerechneten Werte ( $q_{\text{Mm,BTM,ber}}$ ) zur Auswertung der Kultivierungsexperimente abgebildet.

Der kumulative Gehalt sonstiger Zellkomponenten (Residuum) kann gemäß Gleichung (2.7) bestimmt werden:

$$q_{\text{Residuum,BTM,ber}} = 1,00 - q_{\text{Protein,BTM,ber}} - q_{\text{Kohlehydrat,BTM,ber}} - q_{\text{Pigment,BTM,ber}} - q_{\text{Nukleinsäuren,BTM,ber}} \quad (2.7)$$

Das Residuum der Biotrockenmasse  $q_{\text{Residuum,BTM,ber}}$  kann der Lipidfraktion  $q_{\text{Lipid,BTM,ber}}$  zugeordnet werden.

Zur Auswertung einiger Kultivierungsdaten wurde zudem das Konzept der sogenannten aktiven Biomasse (ABM) angewandt. Darunter wird die Zelle ohne die von ihr gebildeten Speicherstoffe Stärke und Lipide verstanden. Dementsprechend besteht die aktive Algenzelle aus Proteinen, Nukleinsäuren, Pigmenten und funktionellen Kohlehydraten und Lipiden. In Abschnitt 4.1.2 werden das Konzept im Detail vorgestellt und die entsprechenden Berechnungen erläutert.

## 2.6.2 Evaluation kontinuierlicher Kultivierungsexperimente

### 2.6.2.1 Produktivität

Die Produktivität  $Pr$  in  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  einer Komponente  $K$  (der Biomasse beziehungsweise eines makromolekularen Zellbestandteils (Protein, Kohlehydrat, Pigment)) während einer Kultivierung wurde nach Gleichung (2.8) mittels der jeweiligen (intrazellulären) Konzentration  $c$  der zu bestimmenden Komponente sowie der eingesetzten Durchflussrate  $D$  bestimmt.

$$Pr_K = c_K \cdot D \quad (2.8)$$

### 2.6.2.2 Lichtverfügbarkeit

Der Reaktor wurde in allen Experimenten der vorliegenden Arbeit mit einer schwarzen Hülle bedeckt, um den Einfluss von natürlichem Tageslicht auf die Kultivierung zu minimieren. Zudem wurde dadurch davon ausgegangen, dass alle eingestrahnten Photonen aufgenommen wurden. Die spezifische Photonen-Absorptionsrate (in  $\mu\text{mol}_{\text{ph}}\cdot\text{g}_{\text{BM}}\cdot\text{s}^{-1}$ ) mittels der an der Innenwand des Glaszylinders gemessenen Lichtintensität  $I_0$ , der beleuchteten Oberfläche  $A$ , dem Kulturvolumen  $V_{\text{Medium,PBR}}$  sowie der im Reaktor vorhandenen Biomassekonzentration  $c_{\text{BM}}$  bestimmt.

$$r_{\text{Ph,abs}} = \frac{I_0 \cdot A}{V_{\text{Medium,PBR}} \cdot c_{\text{BM}}} \quad (2.9)$$

### 2.6.2.3 Nährstoffbilanz in Medium und Zelle

Zur Bilanzierung der Nährstoffe (Allgemein: Index  $E$  für Element) in Kulturmedium und Algenzelle lag der Fokus der vorliegenden Arbeit auf den beiden Elementen Stickstoff (N) und Phosphor (P). Folgende Größen zur Beurteilung der Experimente wurden definiert:

*Nährstoffbereitstellung  $S_E$*

$$S_E = c_{E,\text{Medium}} \cdot D \quad (2.10)$$

Die pro Zeiteinheit in den Reaktor eingebrachte Menge an im Medium gelösten Substraten ( $S_E$  in  $\text{mg}_E\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) ergibt sich als Produkt aus Medienkonzentration und Durchflussrate.

*Nährstoffaufnahme  $U_E$*

$$U_E = (c_{E,\text{Medium}} - c_{E,\text{residual}}) \cdot D \quad (2.11)$$

Aus der Differenz aus der Substrat-Konzentration im frischen Medium sowie im Reaktor-Ausfluss ( $c_{E,\text{Residual}}$ ) wurde die Nährstoffaufnahme pro Zeiteinheit in  $\text{mg}_E\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  bestimmt.

*Nährstoffaufnahme rate  $r_E$* 

Die spezifische Rate  $r_E$  in  $\text{mg}_E \cdot \text{mg}_{\text{BM}}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , mit welcher Nährstoffe in die Zelle aufgenommen werden, wird nach Gleichung (2.12) über den Quotient aus Nährstoffaufnahme und Biomassekonzentration bestimmt.

$$r_E = \frac{U_E}{c_{\text{BM}}} \quad (2.12)$$

*Nährstoffgehalt in der Zelle  $q_E$* 

Der Nährstoffgehalt der Zelle kann aus der Menge an aus dem Medium aufgenommenem N beziehungsweise P ermittelt werden. Hierfür wurde  $r_E$  durch die jeweilige Verdünnungsrate  $D$  geteilt.

$$q_E = \frac{r_E}{D} \quad (2.13)$$

Unter der Annahme, dass der gesamte in der Zelle verfügbare Stickstoff entweder in Form von Proteinen, Pigmenten (gemessen als Chlorophyll) oder Nukleinsäuren gebunden vorliegt, konnte der intrazelluläre N-Gehalt  $q_{\text{N,th}}$  aus den Gehalten der Makromoleküle ( $q_{\text{Mm}}$ ) bestimmt werden. Hierbei wurden zudem die N-Anteile im jeweiligen Makromolekül ( $q_{\text{N,Mm}}$ , Tabelle 2-4) miteinbezogen.

$$q_{\text{N,th}} = c_{\text{BM}} \cdot q_{\text{Mm}} \cdot q_{\text{N,Mm}} \quad (2.14)$$

Tabelle 2-4: Literaturwerte (inklusive Literaturquellen) für Stickstoff-Gehalte in Proteinen, Pigmenten und Nukleinsäuren aus Mikroalgen. Die Werte fanden für die Berechnung des theoretischen N-Gehaltes einer *Chlorella vulgaris* Zelle Einsatz.

<b>Makromolekül</b>	<b><math>q_{\text{N,Mm}}</math></b>	<b>Quelle</b>
Proteine	0,166	Safi et al. 2014
Pigmente (Chl)	0,063	Geider und La Roche 2002
Nukleinsäuren	0,155	Geider und La Roche 2002

## 2.7 Filtrationsexperimente

Konzept, Aufbau, Funktionen und Spezifikationen der Filtrationsanlagen *Harvester* und *Mini-Harvester*, welche für die Filtrationsexperimente der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurden, sind in Kapitel 3 im Detail beschrieben. An dieser Stelle sind lediglich allgemeingültige Methoden und Berechnungen dargestellt, welche unabhängig der eingesetzten Filtrationsanlage gelten.

### 2.7.1 Bestimmung des Filtrat-Flux

Die Filtrationsanlage *Harvester* wurde für den automatisierten Einsatz im Pilotmaßstab konzipiert und daher mit einer Vielzahl an Sensoren ausgestattet. Alle in die Anlage ein- und austretenden Volumenströme wurden mittels dreier Durchflussmesser online quantifiziert.

Im Gegensatz dazu werden diese am *Mini-Harvester* mittels Wägung ermittelt. Im Falle des Filtrat-Flux werden hierfür die Menge an Filtrat ( $\Delta m$ ) innerhalb einer definierten Zeitintervalls  $\Delta t$  dividiert und unter Einbeziehung der temperaturabhängigen Dichte von Wasser  $\rho(T)$  ((VDI-Gesellschaft Verfahrenstechnik und Chemieingenieurwesen 2013)) in einen Filtratvolumenstrom umgerechnet (Gleichung (2.15)). In der vorliegenden Arbeit wurde zur Auswertung der experimentellen Daten ein Zeitintervall von  $\Delta t = 60$  s festgelegt.

$$J_{\text{Filtrat}} = \frac{\Delta m}{\Delta t \cdot \rho(T)} \quad (2.15)$$

### 2.7.2 Membranwiderstand und -permeabilität

Der Wasser-Flux  $J_W$  durch eine saubere Membran kann beschrieben werden als:

$$\text{Flux} = \frac{\text{Triebkraft}}{\text{dynamische Viskosität } \mu_T \cdot \text{Membranwiderstand } R_M} \quad (2.16)$$

Die Triebkraft der Filtration der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Membranfiltrationsanlagen (*Harvester* und *Mini-Harvester*, siehe Kapitel 3) ist der sogenannte Transmembrandruck (TMP).

Vor jedem Filtrationsexperiment wurde die verwendete Membran zunächst durch Filtration von vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) bei konstantem Permeat-Flux für 45 Min konditioniert. Der Wasser-Flux ( $J_W$  in  $\text{L} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ) durch die saubere Membran wurde im Anschluss für mindestens 15 Min gemessen, ebenso wurde der dafür benötigte TMP (in mbar) aufgezeichnet. Der Membranwiderstand konnte so nach Gleichung (2.17) unter Berücksichtigung der temperaturabhängigen dynamischen Viskosität von Wasser ( $\mu_T$  in  $\text{Pa} \cdot \text{s}$ ) berechnet werden.

$$R_M = \frac{\text{TMP}}{J_W \cdot \mu_T} \quad (2.17)$$

Die sogenannte Membranpermeabilität (kurz Permeabilität  $Pe_M$ ) beschreibt den Permeat-Flux  $J$ , welcher pro  $m^2$  Membranfläche und Triebkraft (TMP) durch die Membran fließt (Gleichung **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**) in der Einheit  $L \cdot m^{-2} \cdot h^{-1} \cdot bar$ .

$$Pe_M = \frac{J}{TMP} \quad (2.18)$$

### 2.7.3 Kritischer Flux

Der kritische Flux wurde 1995 von Field et al. definiert ((Field et al. 1995)), als Grenzwert eines Permeat-Flux – des sogenannten kritischen Flux  $J_c$ , unterhalb dessen kein Fouling auftritt. Bis heute wurden weitere Unterteilungen (z. B. starke/schwache Form des kritischen Fluxes) klassifiziert (Le Clech et al. 2003), welche allerdings im Zuge dieser Arbeit nicht näher unterschieden werden. Unter dem Begriff "kritischer Flux" wird an dieser Stelle also der maximale Permeat-Flux verstanden, oberhalb dessen bei einer Filtration mit konstantem Transmembrandruck ein messbarer Druckanstieg auftritt. In der Literatur sind verschiedene Methoden zur Ermittlung des kritischen Flux beschrieben (Bacchin P., Aimar P., Field R. W. 2006). Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden zwei Methoden angewandt (modifizierte Flux-Step-Methode (engl.: *Modified-Flux-Step*, kurz MFS) sowie verbesserte Flux-Step-Methode (engl.: *Improved-Flux-Step*, kurz IFS)), welche auf der sogenannten Flux-Schritt Methode (engl.: *Flux-Step*) basieren. Dabei wird eine partikelbeladene Suspension filtriert, wobei der Permeat-Flux in konsekutiven, konstanten Schritten erhöht wird, bis ein Anstieg des zur Aufrechterhaltung des konstanten Flux notwendigen Transmembrandrucks messbar wird ( $dTMP/dt$ ). Ab einer zuvor festgelegten Grenze der Druckerhöhung ist der kritische Flux  $J_c$  erreicht. Der Vorteil der MFS- und IFS-Verfahren im Vergleich zur klassischen Flux-Step Methode beruht auf einer Reduktion der Fouling-Phänomene eines vorangegangenen Flux-Schrittes, wodurch  $J_c$  von der Anzahl an vorhergehenden Flux-Schritten unabhängig bestimmt und damit exakter wird. Prinzipiell unterscheiden sich beide Vorgehensweisen im zeitlichen Aufwand sowie dem Informationsgehalt der erzeugten Daten.

Diez et al. beschrieben im Jahr 2014 die modifizierte Flux-Schritt Methode (Diez et al. 2014). Zur Reduktion von reversiblen Fouling-Einflüssen eines vorangegangenen Flux-Schrittes wird Rückspülen zwischen den einzelnen Schritten angewandt. Diese Maßnahme führt zur Ablösung von an der Membran angelagerten Partikeln sowie deren Rückdiffusion in die umgebende Phase. Im Vergleich der TMP-Zeit-Profile der FS- sowie MFS-Methode (Abbildung 2-9) geht die verbesserte Reproduzierbarkeit zwischen auf- und absteigendem Ast durch die Entfernung des reversiblen Foulings der MFS-Methode deutlich hervor.

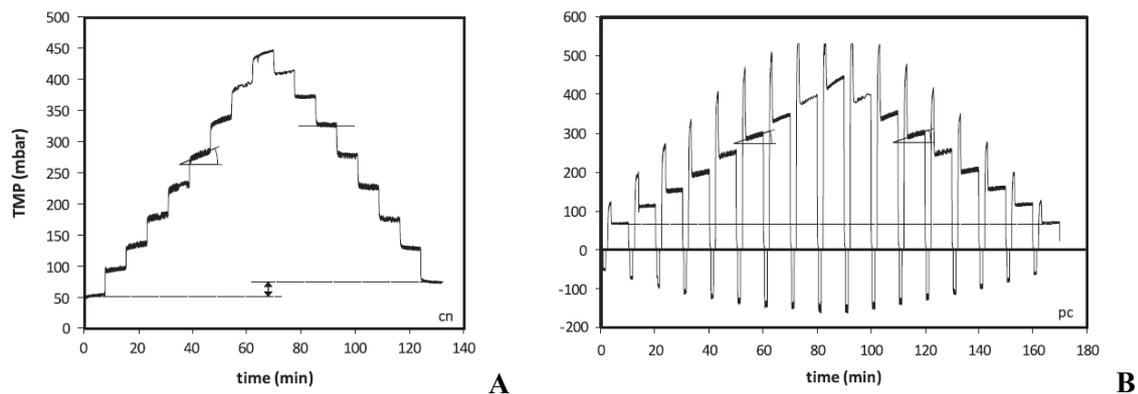


Abbildung 2-9: TMP-Zeit Profile der (A) FS-Methode und (B) MFS-Methode eines moderat gefaulten Membranmoduls eines Membran-Bioreaktors. (Feststoffgehalt =  $6,39 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) Quelle: Diez et al. 2014.

Die verbesserte Flux-Schritt Methode wurde von van der Marel et al. 2009 vorgestellt. Auch bei dieser Methode wird der Einfluss des Foulings eines vorangegangenen Flux-Schrittes auf den nächsten Schritt minimiert: Hierfür wird zwischen zwei Flux-Schritten mit einem sogenannten hohen Flux (engl.: *high Flux*,  $J_H$ ) ein unterkritischer, niedriger Flux (engl.: *low Flux*,  $J_L$ ) eingestellt (Abbildung 2-10). Im auf einen  $J_H$  folgenden  $J_L$ -Intervall kann eine Rückdiffusion der an der Membran angelagerten Partikel stattfinden, welche ggf. durch Belüftung unterstützt wird. Dadurch wird der Einfluss des reversiblen Foulings des vorangegangenen Flux-Schrittes auf den nachfolgenden reduziert. Die IFS-Methode erlaubt neben der Bestimmung der Lage des kritischen Flux (über  $J_H$ -Intervalle) eine Quantifizierung des irreversiblen Foulings über die Entwicklung des sich einstellenden TMPs während der Intervalle mit niedrigem Flux  $J_L$ , welches durch Anlegen von  $J_L$  nicht entfernt wird (Abbildung 2-10).

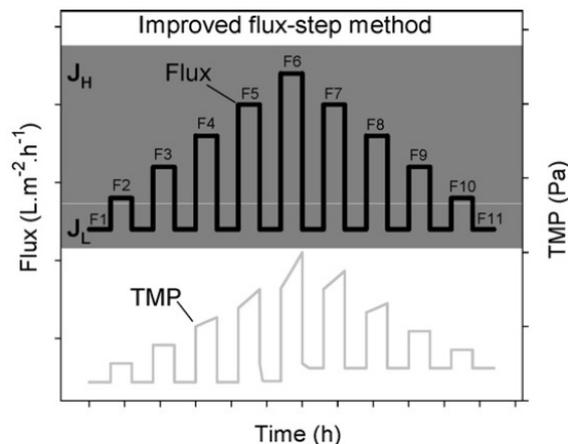


Abbildung 2-10: Schematisches Permeat-Flux- sowie TMP-Zeit Profil der IFS-Methode. Quelle: van der Marel et al. 2009.

Für die Ermittlung des kritischen Flux beeinflussen der Start-Flux sowie die gewählte Schritthöhe die exakte Lage des ermittelten Wertes von  $J_c$ , und sind daher stets anzugeben. Werden lebende Mikroorganismen Kulturen eingesetzt, sollten die Zellen möglichst geringem Stress (Versuchsdauer, mechanischer Stress durch Pumpen, etc.) ausgesetzt werden. Da die Versuchs-

dauer der IFS-Methode sehr hoch ist, wurde für bestimmte Ansätze die wesentlich zeiteffizientere MFS-Methode angewandt. Tabelle 2-5 fasst die wesentlichen Informationen aller Versuchsansätze der vorliegenden Arbeit zur Bestimmung des kritischen Flux zusammen.

Für beide Methoden wurde in jedem Schritt-Intervall der konstante Flux für einen Zeitraum von 10 Min eingestellt und der sich einstellende Transmembrandruck (TMP) im zeitlichen Verlauf aufgezeichnet. Zur Auswertung jedes Intervalls wurde der Druckanstieg ( $dTMP/dt$ ) jedes Flux-Schrittes über eine lineare Regression ermittelt. Ein kritischer TMP-Anstieg von  $10 \text{ Pa}\cdot\text{min}^{-1}$  wurde analog zu van der Marel et al. 2009 gewählt.

Tabelle 2-5: Start-Flüsse und Flux-Schritt Höhen der kritischer Flux Experimente verschiedener Mikroorganismen Spezies und Belüftungsraten der Membranfasern.

Mikroorganismus	Start-Flux	Flux-Schritt	Methode
	$J_{\text{Start}}$ in $\text{L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$	Höhe	
<i>S. cerevisiae</i>	9,16	2,30	(0,00 und 1,25 vvm)
	13,75	2,30	
<i>C. vulgaris</i> SAG 211-12	10,30	1,16	(BTM $1,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )
	13,70	2,30	
<i>C. vulgaris</i> R-117	9,16	0,90	(alle BTMs)

## 2.7.4 Evaluation von Filtrationsprozessen

### 2.7.4.1 Filtrationswiderstand

Die Filtration von partikelbeladenen Suspensionen führt zu einer Erhöhung des Filtrationswiderstandes, bedingt durch Fouling-Effekte. Der gesamte Filtrationswiderstand  $R_{\text{ges}}$ , welcher vom Permeat überwunden werden muss, kann mit dem Darcy'schen Gesetz (Gleichung (2.19)) berechnet werden (Field et al. 1995; Kanchanatip et al. 2016).

$$J = \frac{\text{TMP}}{R_{\text{ges}} \cdot \mu_{\text{T}}} \quad (2.19)$$

Nach dem Widerstand-in-Reihe Modell (engl.: *Resistance-in-Series*) wird gemäß Gleichung (2.20)  $R_{\text{ges}}$  als die Summe aus  $R_{\text{M}}$  (Widerstand der sauberen Membran, Gleichung (2.17)) und  $R_{\text{Fouling}}$  (der durch Fouling-Effekte verursachte Widerstand) definiert.  $R_{\text{Fouling}}$  wiederum setzt sich zusammen aus dem reversiblen Fouling Widerstand ( $R_{\text{reversibel}}$ ) sowie dem irreversiblen Fouling Widerstand ( $R_{\text{irreversibel}}$ ).

$$R_{\text{ges}} = R_{\text{M}} + R_{\text{Fouling}} = R_{\text{M}} + R_{\text{reversibel}} + R_{\text{irreversibel}} \quad (2.20)$$

Entsprechend der in der vorliegenden Arbeit gewählten Definition kann irreversibles Fouling nicht durch Maßnahmen wie Rückspülen von der Membran entfernt werden, wohingegen reversible Fouling-Effekte dadurch reduziert beziehungsweise entfernt werden (siehe Abbildung 2-11). (Massé et al. 2015; Rezakazemi et al. 2018)

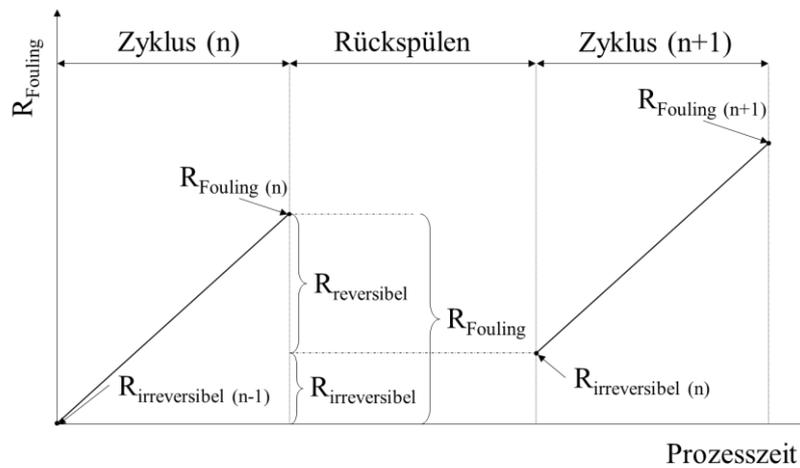


Abbildung 2-11: Definition des Fouling-Widerstandes ( $R_{\text{Fouling}}$ ) während der Membranfiltration partikelbeladener Suspensionen.  $R_{\text{Fouling}}$  ergibt sich als Summe aus reversiblen ( $R_{\text{reversibel}}$ ) und irreversiblen Fouling-Widerstand ( $R_{\text{irreversibel}}$ ). Quelle: modifiziert nach Massé et al. 2015.

#### 2.7.4.2 Bewertungskriterien Filtrationsprozess

Zur Evaluation eines Filtrations-Prozesses wurden ein volumetrischer Reduktionsfaktor (VRF) sowie ein Konzentrationsfaktor (CF) gemäß den Gleichungen (2.21) sowie (2.22) definiert. Hierfür werden das Ausgangs- ( $V_0$ ) sowie Endvolumen ( $V_f$ ) beziehungsweise die Biomassekonzentrationen zu Beginn ( $c_0$ ) sowie am Ende ( $c_f$ ) eingesetzt. (Zhang et al. 2010)

$$\text{VRF} = \frac{V_0}{V_f} \quad (2.21)$$

$$\text{CF} = \frac{c_f}{c_0} \quad (2.22)$$

Zur Beurteilung der Qualität des von der Membran erzeugten Permeats wurde die sogenannte Ernteeffizienz  $\eta_{\text{Ernte}}$  nach Gleichung (2.23) über die optische Dichte (OD) der Ausgangssuspension (Feed) sowie des Permeats bestimmt. Diese gibt an, welcher Anteil der Biomasse die Membran passiert und damit im Permeat wiederzufinden ist. Ein Wert von 100 % bedeutet dabei eine vollständige Rückhaltung aller Feststoffpartikel durch die Membran.

$$\eta_{\text{Ernte}} = \frac{\text{OD}_{\text{Feed}} - \text{OD}_{\text{Permeat}}}{\text{OD}_{\text{Feed}}} \quad (2.23)$$

### 2.7.4.3 Bewertungskriterien Fouling-Kontrolle

#### Rückspülen

Zur Bewertung der Wirksamkeit des Rückspülens zur Reduktion von Membran-Fouling wird die Rückspüleffizienz (RS-Effizienz)  $\eta_{RS}$  eingesetzt und gemäß Gleichung (2.24) berechnet und in % angegeben. (Vera et al. 2015; Viruela et al. 2018) Hierfür wurden der Membranwiderstand  $R_{ges}$  am Anfang (0) und Ende (f) zweier konsekutiver Filtrationszyklen (n-1) und n sowie der Widerstand der sauberen Membran  $R_M$  eingesetzt (siehe Abbildung 2-12).

$$\eta_{RS} = \frac{R_{ges,f} - R_{ges,0}}{R_{ges,f} - R_M} \quad (2.24)$$

Die Rückspüleffizienz des Zyklus (n-1)-n entspricht der Effizienz des Rückspülvorganges zwischen den Zyklen n sowie (n-1).

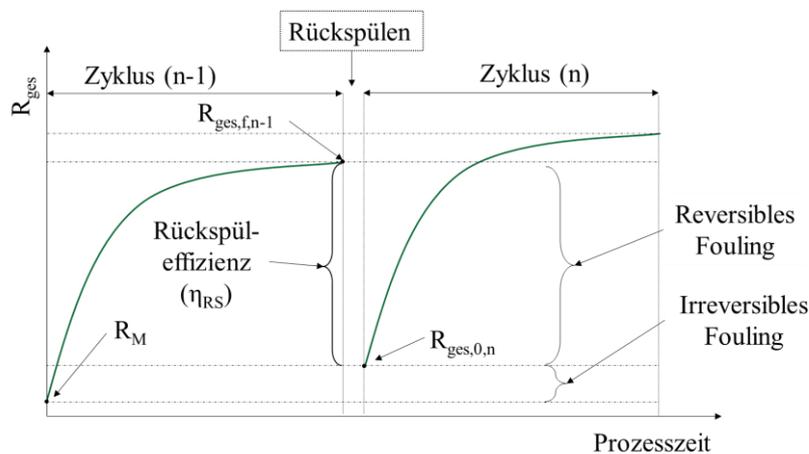


Abbildung 2-12: Rückspüleffizienz ( $\eta_{RS}$ ) zwischen (n-1) und n Filtrationszyklen mit periodischem Rückspülen zwischen den Zyklen. Quelle: eigene Darstellung nach Vera et al. 2015 und Villarroel et al. 2013.

#### Pausieren

Analog zu  $\eta_{RS}$  wurde die sogenannte Pausiereffizienz  $\eta_{PA}$  zur Bewertung der Wirksamkeit der Anti-Fouling-Maßnahme des zyklischen Pausierens gemäß Gleichung (2.25) definiert. Hierfür wurde der Transmembrandruck (TMP) am Beginn zweier konsekutiver Filtrationszyklen (n-1) ( $TMP_{n-1}$ ) und n ( $TMP_n$ ) ins Verhältnis gesetzt (siehe Abbildung 2-13). Die PA-Effizienz des Zyklus (n-1)-n entspricht gilt auch hier zwischen den Zyklen n und (n-1).

$$\eta_{PA} = \frac{TMP_{n-1}}{TMP_n} \quad (2.25)$$

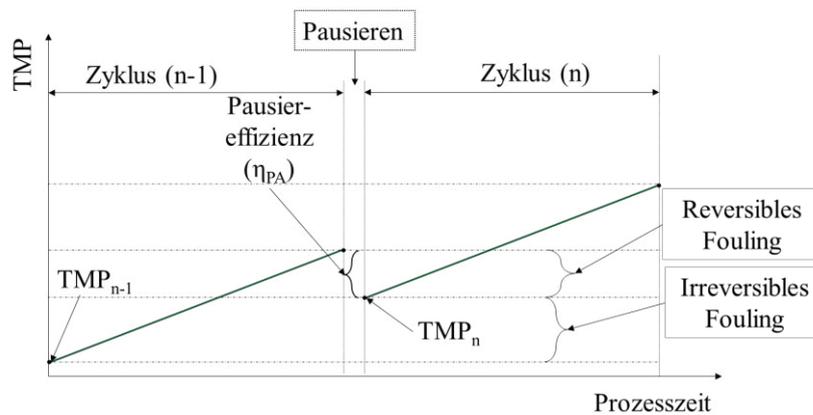


Abbildung 2-13: Definition der Pausiereffizienz ( $\eta_{PA}$ ) zwischen (n-1) und n Filtrationszyklen mit periodischem Pausieren zwischen den Zyklen. Quelle: eigene Darstellung.

## 2.7.5 Fraktionierte Filtration von Algensuspensionen (*Mini-Harvester*)

### 2.7.5.1 Vorbereitung der Algensuspension

Zur Untersuchung des Fouling-Verhaltens der eingesetzten Membran der Filtrationsanlagen, soll der Beitrag der verschiedenen Komponenten einer Mikroalgensuspension (Zellen und in der flüssigen Phase gelöste Organik) zum Membran-Fouling durch die getrennte Filtration der einzelnen Fraktionen untersucht werden. Das Fouling-Profil wurde im Anschluss mit dem Filtrations-Profil der nativen Algensuspension verglichen. Die zu untersuchende Algenkultur stammte jeweils aus einer vorangegangenen Kultivierung im Satzbetrieb.

Für die fraktionierte Filtration (Abbildung 2-14) axenischer Mikroalgenkulturen (Kapitel 3.4.1) wurde die native Algensuspension (Fraktion 1) in zwei Stufen zentrifugiert (3.000 g, 10 min), um einen zellfreien Überstand (Fraktion 2) zu erhalten. Das Zellpellet wurde im Anschluss in VE-Wasser (Fraktion 3) beziehungsweise frischem Medium (Fraktion 4) resuspendiert, wobei eine konstante Biomassekonzentration eingestellt wurde. Wurde als Kulturmedium ein reales Abwasser eingesetzt, wurde dieses als Fraktion 5 ebenso filtrierte.

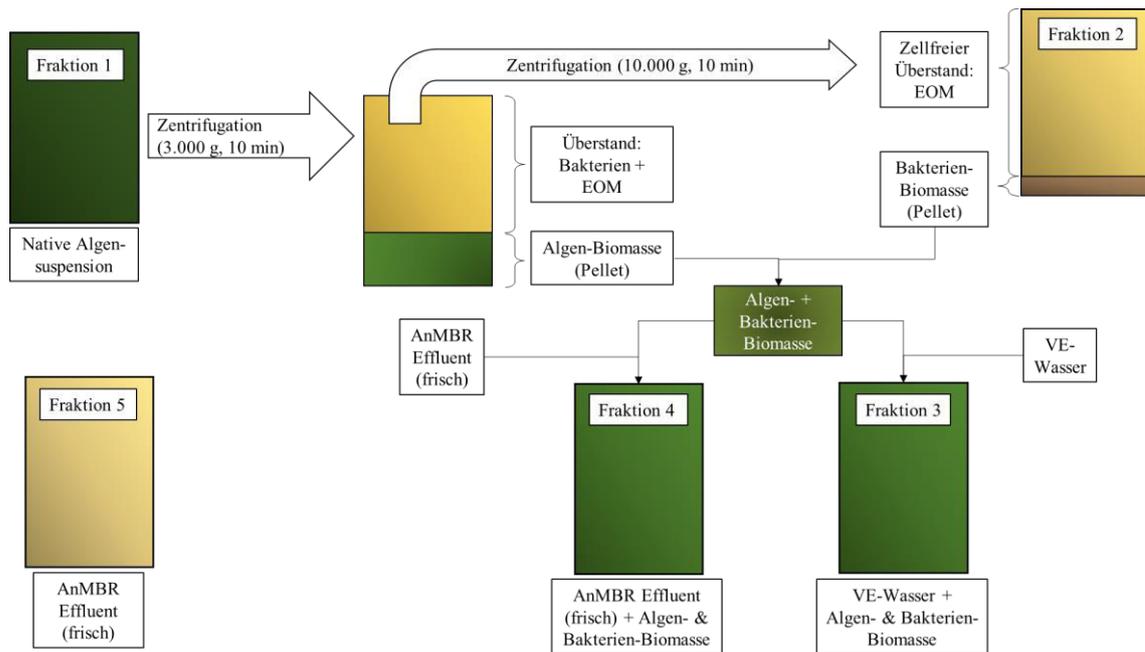


Abbildung 2-14: Fraktionierung der Algenbiomasse für die Untersuchung des Fouling-Verhaltens der einzelnen Komponenten. Fraktion 1 (F1): Native Algensuspension, Fraktion 2 (F2): Zellfreier Überstand mit EOM nach 2-facher Zentrifugation, Fraktion 3 (F3): Algen- und Bakterien-Biomasse resuspendiert in VE-Wasser, Fraktion 4 (F4): Algen- und Bakterien-Biomasse resuspendiert in frischem Medium, Fraktion 5 (F5): frisches Medium. (EOM: extrazelluläres organisches Material)

Bei nicht-axenischen Kultivierungen (Kapitel 3.4.2) war ein weiterer Zentrifugationsschritt (10.000 g, 10 min) notwendig, um die Bakterienzellen aus dem Überstand abzutrennen. Diese wurden im Anschluss dem Algenpellet beigefügt und sind somit in den zellhaltigen Fraktionen 3 und 4 vorhanden.

Variierte die Biomassekonzentration der nativen Suspension aufgrund unterschiedlicher Kultivierungszeiträume (Kapitel 3.4.1), wurden zwei Ansätze der Fraktion 3 hergestellt: In Fraktion 3a wurde die Biomassekonzentration entsprechend Fraktion 1 eingestellt, wohingegen die Zellkonzentration in Fraktion 3b einem zuvor festgelegten, geringeren Wert entsprach. Dieser Wert orientierte sich an den minimalen, in vorangegangenen Kultivierungen erzielten Biomassekonzentrationen, mit dem Ziel, für jeden Kulturansatz eine vergleichbare Fraktion zu filtrieren.

### 2.7.5.2 Versuchsablauf Filtrationsexperimente

Zur Untersuchung des Fouling Verhaltens während der Filtration der verschiedenen Fraktionen einer Algensuspension wurde die Filtrationsanlage *Mini-Harvester* in einfachem Aufbau eingesetzt, welcher im Folgenden in Kapitel 3.1.2 detailliert erläutert wird. Nachstehende Tabelle fasst die relevanten Parameter der verschiedenen Experimente zusammen. Der Permeat-Fluss wurde nach Gleichung (2.15) ermittelt.

Tabelle 2-6: Überblick der Parameter der fraktionierten Filtration von Algensuspensionen mittels des *Mini-Harvesters* im einfachen Aufbau in mehreren konsekutiven Filtrationszyklen (Z). Die Membranfasern wurden zwischen den Zyklen mit VE-Wasser rückgespült.

Kapitel	Spezies	Membran- fläche (m <sup>2</sup> )	TMP (mbar)	Filtrations- zyklen	Rückspülen			
					Dauer (s)	Zyklus (min)	Druck (mbar)	
3.4.1	<i>C. vulgaris</i>	0,0108	200	3	60	15	100	
3.4.2	<i>Desmodesmus Coelastrella</i>	0,0160	100	5	Z1-3	45	10	200
					Z4-5	45	5	200

Im Zuge der Experimente wurden jeweils verschiedene Mikroalgen-Suspensionen (Ansätze) fraktioniert filtriert und verglichen. Vor der Filtration der einzelnen Fraktionen eines jeden Ansatzes, wurde der *Mini-Harvester* mitsamt Membran chemisch mit verdünnter Natrium-Hypochloritlösung (2 % (v/v)) entsprechend des Reinigungsprotokolls (siehe Anhang 8.3.3) gereinigt und der Widerstand der sauberen Membran  $R_M$  mittels VE-Wasser nach vorhergehender Konditionierung gemessen (Vorgehen siehe Kapitel 2.7.2). Die Mikroalgenkulturen wurden im Anschluss wie beschrieben fraktioniert und in mehreren aufeinander folgenden Zyklen filtriert. Zwischen den einzelnen Zyklen wurden die Membranfasern mit VE-Wasser rückgespült. Am Ende der Filtration einer jeden Fraktion wurden *Mini-Harvester* und Membranfasern mittels VE-Wasser gereinigt und  $R_M$  im Anschluss erneut bestimmt.

# 3 Membran Filtrationsanlagen – Entwicklung, Charakterisierung und Betrieb

## 3.1 Konzeption und Automatisierung

Ein grundlegendes Problem des Einsatzes von Mikroalgen in der Abwasseraufbereitung ist das langsame Wachstum der Mikroalgenzellen, wodurch kontinuierliche Aufarbeitungsprozesse auf Durchflussraten  $< 1 \text{ d}^{-1}$  limitiert sind (Acién Fernández et al. 2018). Verschiedene Studien und Modellierungen konnten bereits im Ansatz zeigen, dass eine Rückführung von Algenzellen während der Kultivierung stabile Betriebspunkte oberhalb der maximalen spezifischen Wachstumsrate  $\mu_{\max}$  der Mikroalgenzellen erlaubt und zudem die Effizienz der Substrataufnahme erhöht (Bilad et al. 2014b; Discart et al. 2014; Bilad et al. 2014a; Marbelia et al. 2014). Die Kopplung einer externen Abtrenneinheit an einen kontinuierlich betriebenen Photobioreaktor gestattet ein Aufkonzentrieren der aus dem PBR entnommenen Zellen, welche im Anschluss in die Kultivierungseinheit zurückgeführt werden können. An die Abtrenneinheit werden dabei einige zentrale Anforderungen gestellt: Neben einer scherarmen Betriebsweise mit möglichst geringem Stress für die zu separierenden Zellen, sollte die Anlage energiearm und ohne Chemikalieneinsatz arbeiten. Eine direkte Kopplung an den PBR, die Abtrennung im kontinuierlichen Betrieb sowie die Möglichkeit zur gezielten Anpassung der Biomassekonzentration im PBR sind weitere wichtige Kriterien. Die Mikroalgenabtrennung mittels Membranfiltration adressiert die beschriebenen Anforderungen sehr gut, wodurch sie die optimale Methodik für die angesprochene Aufgabe darstellt. Ein wesentlicher Meilenstein der vorliegenden Arbeit war daher die Entwicklung einer Membranfiltrationseinheit zur sensitiven Ernte von Mikroalgen.

In der Konzeption wurden zwei zentrale Aspekte berücksichtigt: An die Filtereinheit als „Werkzeug“ zur Algenabtrennung werden als Anforderungen ein möglichst geringer Energieeintrag sowie eine geringe Fouling-Neigung der eingesetzten Membran gestellt. Zudem soll diese an einen Photobioreaktor zu koppeln sein, welcher zur kontinuierlichen Abwasseraufbereitung im Tag/Nacht-Betrieb eingesetzt wird. Für dieses Ziel war die Automatisierung der Anlage ein wesentlicher Baustein, um in den Prozess der Abwasserreinigung eingreifen zu können, indem die Biomassekonzentration im Reaktor durch Zellrückführung gezielt beeinflusst wird.

Parallel wurden daher Filtrationsanlagen in zwei Maßstäben aufgebaut: Der sogenannte *Harvester* im Pilotmaßstab sowie der sogenannte *Mini-Harvester* im Labormaßstab. Beide Anlagen werden im Folgenden im Detail vorgestellt.

### 3.1.1 Filtrationsanlage *Harvester* im Pilotmaßstab

#### 3.1.1.1 Konzeption und Aufbau

Die Algenabtrennanlage *Harvester* wurde mit einem Anlagenvolumen von 12-15 L für den Pilotbetrieb entwickelt. Der Korpus des *Harvesters* wurde am Institut aus kommerziell erhältlichen Einzelteilen (Korpus: Plexiglas®, Anschlüsse und Verbindungen: Polyvinylchlorid (PVC)) zusammengebaut und an einem fahrbaren Gestell montiert (Abbildung 3-1 und Abbildung 8-3). Die Abmessungen des *Harvesters* sind im Anhang in Abbildung 8-2 dargestellt. Zur fest-flüssig Trennung wurde ein getauchtes Membranmodul mit Hohlfasern (Ultrafiltrationsmembran) eingesetzt, welches in Abschnitt 3.2.1 vorgestellt wird. Der Einsatzbereich des *Harvesters* ist sehr flexibel und kann die Forschung bis zum realen Anwendungsfall umfassen. Je nach den Bedürfnissen der Anwendung kann ein Umbau beziehungsweise eine Vereinfachung der Anlage mit geringem Aufwand erfolgen. Für den automatisierten Betrieb der Anlage ist ein Schaltschrank mit einer speicherprogrammierbaren Steuerung angebracht (Abbildung 3-1 A), welche mit einem Laptop verbunden wird. Dadurch kann die gesamte Anlage sehr flexibel an einem beliebigen Ort mit Strom- und Druckluftversorgung betrieben werden.

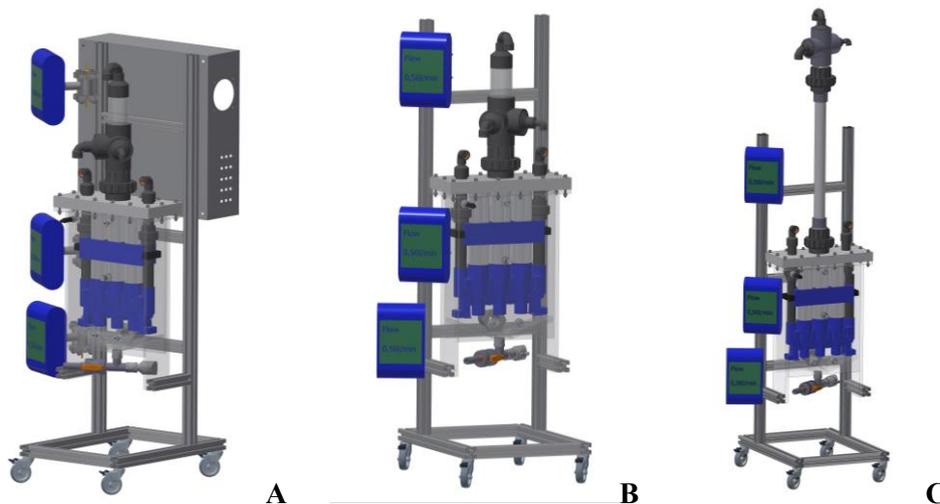


Abbildung 3-1: Technische Zeichnungen der Membranfiltrationsanlage *Harvester* ohne (A, B) und mit (C) Rohr zur Erzeugung eines hydrostatischen Drucks über der Membran. Der *Harvester* besteht aus einer Trennkammer mit begasbarem Membranmodul sowie Anschlüssen für alle ein- und austretenden Volumenströme. Der Einsatz von Pumpen und Sensorik kann variabel an die Bedürfnisse der Anwendung angepasst werden.

Der *Harvester* besteht im Wesentlichen aus einer Trennkammer mit Membranmodul sowie Anschlüssen für die ein- und austretenden Volumenströme. Der für die Filtration benötigte Transmembrandruck kann auf zwei Arten erzeugt werden: Zunächst kann ein über der Trennkammer liegendes Rohr eingebaut werden (Abbildung 3-1 B & C). Dieses erzeugt im gefüllten Zustand einen ausreichend großen hydrostatischen Druck oberhalb der Membran (Transmembrandruck) zur Realisierung eines Filtrat-Flusses. Alternativ kann eine Pumpe eingesetzt werden. Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurde eine Zahnradpumpe zur Erzeugung des Filtrat-Flux verwendet, um reproduzierbare Bedingungen sowie eine flexible Regelung und die

Realisierung verschiedener Betriebsweisen der Filtration (konstanter Permeat-Flux beziehungsweise konstanter TMP) zu ermöglichen. Das die Membran passierende Filtrat wird an der Innenseite der Membranfasern gesammelt und kann über ein seitlich angebrachtes Rohr abgenommen werden. Ein entsprechender Anschluss ist am oberen Teil der Trennkammer angebracht. Am unteren Ende der Trennkammer ist der Auslauf für die aufkonzentrierte Suspension (Retentat) installiert. Auch hier kann bei Bedarf eine Reduzierung der Anlage erfolgen, indem die entsprechende Pumpe ausgebaut wird und der auslaufende Strom über die Ventilstellung manuell reguliert wird. Die Triebkraft hierbei entsteht durch den hydrostatischen Druck der darüber liegenden Flüssigkeitssäule. Die zu trennende Zellsuspension wird am oberen Teil der Trennkammer über eine obligate Peristaltikpumpe zugeführt. Das eingesetzte Membranmodul ist kommerziell erhältlich und kann automatisiert oder manuell belüftet werden. Das Rückspülen der Membranfasern erfolgt entweder über eine externe Wasserversorgung mit Druckreduktion (steuern des Rückspülflusses durch ein Ventil) oder aber mittels der eingebauten Zahnrادpumpe. Die eingebaute Sensorik am *Harvester* erlaubt die prozessbegleitende Messung von relevanten Größen (Volumenströme, Drücke, etc.), welche für einen vollautomatisierten Anlagenbetrieb obligatorisch sind. Wird eine weniger komplexe Ausführung gewünscht, kann der apparative Aufwand an dieser Stelle jedoch unproblematisch reduziert werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit etablierte Automatisierung (siehe Kapitel 3.1.1.3) ermöglicht den Einsatz des *Harvesters* für zwei verschiedene Aufgaben- beziehungsweise Zielstellungen: Einerseits kann dieser als reine Ernteanlage zur Aufkonzentrierung von Algen (im Satz- oder kontinuierlichen Betrieb) angewandt werden. Zudem ist die „aktive“ Kopplung an einen Photobioreaktor möglich, wodurch letzterer zu einem Algen-Membran-Photobioreaktor (AMPBR) mit externer Membran erweitert wird. Hierbei steht die Beeinflussung der Biomassekonzentration im PBR im Fokus.

### 3.1.1.2 Ausstattung und Betrieb

Das Rohrleitungs- und Instrumentenfließschema (R&I-Fließschema) der Filtrationsanlage *Harvester* inklusive der benötigten Peripherie ist in Abbildung 3-2 A abgebildet.

Die zu trennende, zellhaltigen Suspension wird dem *Harvester* (Abbildung 3-2 B & C) über eine Peristaltikpumpe aus einem gekoppelten Photobioreaktor (Mikroalgen) beziehungsweise Vorlagebehälter (Hefe) zugeführt. Prozessbegleitend kann die Biomassekonzentration dieser Ausgangssuspension mittels eines Trübungssensors quantifiziert werden. Das in der Trennkammer befindliche Membranmodul, besteht aus insgesamt drei Bündeln von belüfteten, getauchten Polyvinylidenfluorid (PVDF) Hohlfasermembranen (siehe Abschnitt 3.2). Das Permeat oder Filtrat wird auf der Innenseite der Membranfasern abgezogen („Out-In“-Betrieb). Die Triebkraft der Filtration ist ein Transmembrandruck (TMP), welcher über eine Zahnrادpumpe angelegt und prozessbegleitend über einen Drucksensor gemessen wird. Die beiden Betriebsweisen „konstanter Permeat-Flux“ sowie „konstanter Filtrationsdruck“ sind durch die eingesetzte Pumpe realisierbar. Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurde stets ein konstanter Permeat-Flux durch Anlegen und Anpassen eines entsprechenden Unterdrucks (TMP) generiert. Im automatisierten Betrieb wird der Istwert des Filtrat-Flux gemessen und auf einem konstanten Wert ggf. durch Erhöhung des TMP gehalten. Die Hohlfasern werden mit Druckluft umspült, um Fouling an der Membranoberfläche zu verringern. Der angewandte Luftvolumenstrom wird

dabei mittels eines Massendurchflussmessers gesteuert. Periodisches Rückspülen mit Leitungswasser kann weiterhin zur Reduktion von Membran-Fouling angewandt werden. Der hierbei angelegte Druck wird über einen Druckminderer eingestellt und prozessbegleitend über einen Druckmesser gemessen.

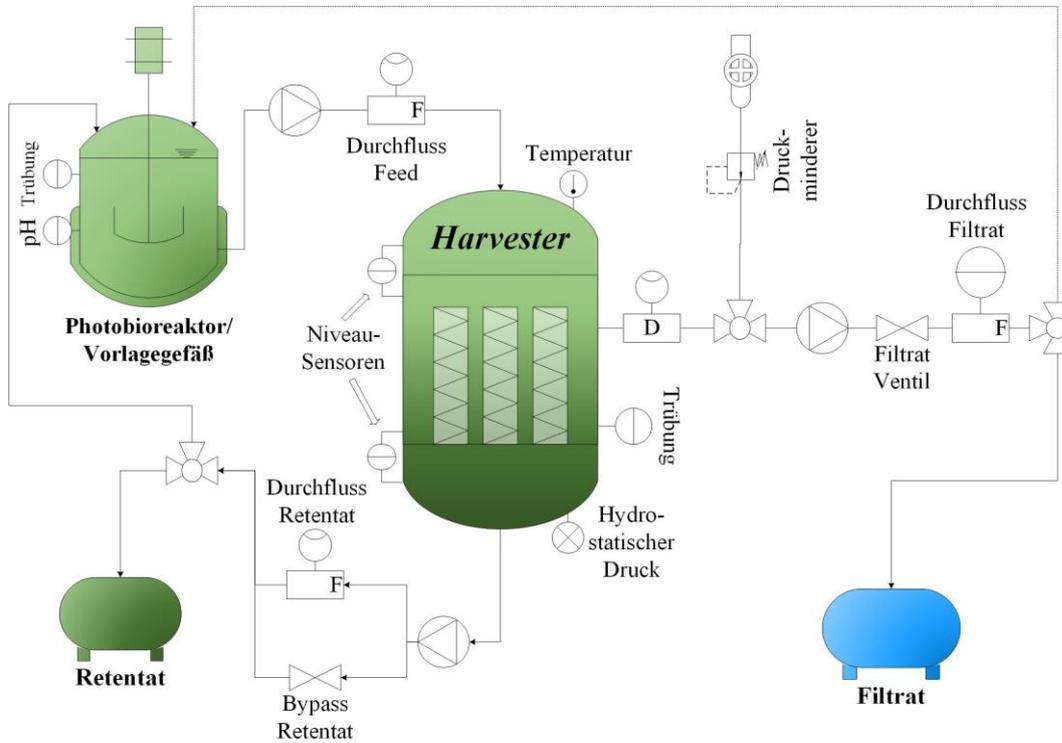


Abbildung 3-2: R&I-Fließschema der Filtrationsanlage *Harvester* (A) sowie Fotos der Anlage inkl. Peripherie mit einer Algensuspension (B) beziehungsweise Wasser (C) gefüllt. Quelle: eigene Zeichnung und Aufnahmen.

Die aufkonzentrierte Zellsuspension (Retentat) wird über eine Peristaltikpumpe aus dem *Harvester* gefördert. Dabei ist ein Rückführen der Zellen in das Vorlagegefäß beziehungsweise den Photobioreaktor möglich. Alternativ kann das Retentat in einem separaten Retentattank gesam-

melt und die Zellen somit aus dem System genommen werden. Alle angewandten Flüsse (Ausgangssuspension, Retentat und Permeat) werden prozessbegleitend über Durchflussmesser quantifiziert. Die Temperatur, Biomassekonzentration (via Trübung) in der Trennkammer des *Harvesters* sowie die Füllhöhe (über einen hydrostatischen Drucksensor) werden ebenso gemessen.

Vor jedem experimentellen Einsatz des *Harvesters* wurde die Filtrationsanlage gemäß des Reinigungsprotokolls (siehe Kapitel 8.3.1) gesäubert. Alle gemessenen Prozessparameter wurden prozessbegleitend für die Visualisierung, Berechnungen und die Regelung im Prozessleitsystem zur Verfügung gestellt und zudem aufgezeichnet.

### 3.1.1.3 Automatisierung

Ein weiteres Ziel der Entwicklung der Filtrationsanlage *Harvester* war deren automatisierter Betrieb. Nicht nur einfachere Funktionen wie beispielsweise ein konstanter Füllstand oder das selbstständige Leeren/Füllen der Anlage, sondern auch komplexere Aufgaben wie etwa die Regelung einer vorgegebenen Biomassekonzentration in der Trennkammer oder im gekoppelten PBR sollten dabei realisiert werden können. Hierfür wurde ein LabVIEW-basiertes Programm zur Prozessautomatisierung (*BioProCon*) (weiter)entwickelt, welches institutsintern bereits zur Steuerung und Regelung verschiedener Anlagen etabliert und eingesetzt wurde. Um den *Harvester* auch für externe Anwender interessant zu gestalten, wurde bei der Automatisierung auf Bedienerfreundlichkeit und Übersichtlichkeit geachtet (siehe Abbildung 3-3). Für die im Folgenden beschriebenen möglichen Anwendungen sind vom Experimentator lediglich die entsprechenden Vorgaben für den gesteuerten Betrieb in die jeweiligen Eingabeflächen einzugeben (Abbildung 3-4 A-C). Auch ist ein manueller Anlagenbetrieb (ohne Automatisierung) möglich, welche allerdings ein tiefgehendes Verständnis von Anlage und Peripherie voraussetzt.

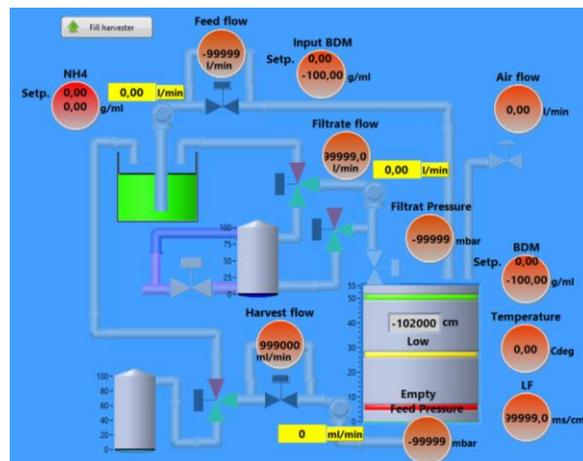


Abbildung 3-3: Verfahrensfliessbild mit Anzeige der an der Anlage gemessenen Größen des *Harvesters* im Prozessleitsystem *BioProCon*. Das LabVIEW-basierte Programm zur Prozessautomatisierung wurde institutsintern entwickelt und für den automatisierten Betrieb des *Harvesters* erweitert.

Unabhängig des gewünschten Einsatzes (reine Algenernte oder Kopplung an einen PBR) kann das Füllen und Leeren des *Harvesters* automatisch geschehen. Levelsensoren geben dabei den Zustand der Anlage bezüglich des Füllstandes an. Ein Beenden des Prozesses (welches das

selbstgesteuerte Leeren einleitet) kann nach einer vorgegebenen Laufzeit, einem definierten Volumen an prozessierter Ausgangssuspension, erzeugtem Permeat oder ausgetragenen Retentat sowie einer gewünschten Biomassekonzentration in der Trennkammer ausgelöst werden (Abbildung 3-4 B). Falls erforderlich ist auch ein manuelles Abschalten der Anlage möglich.

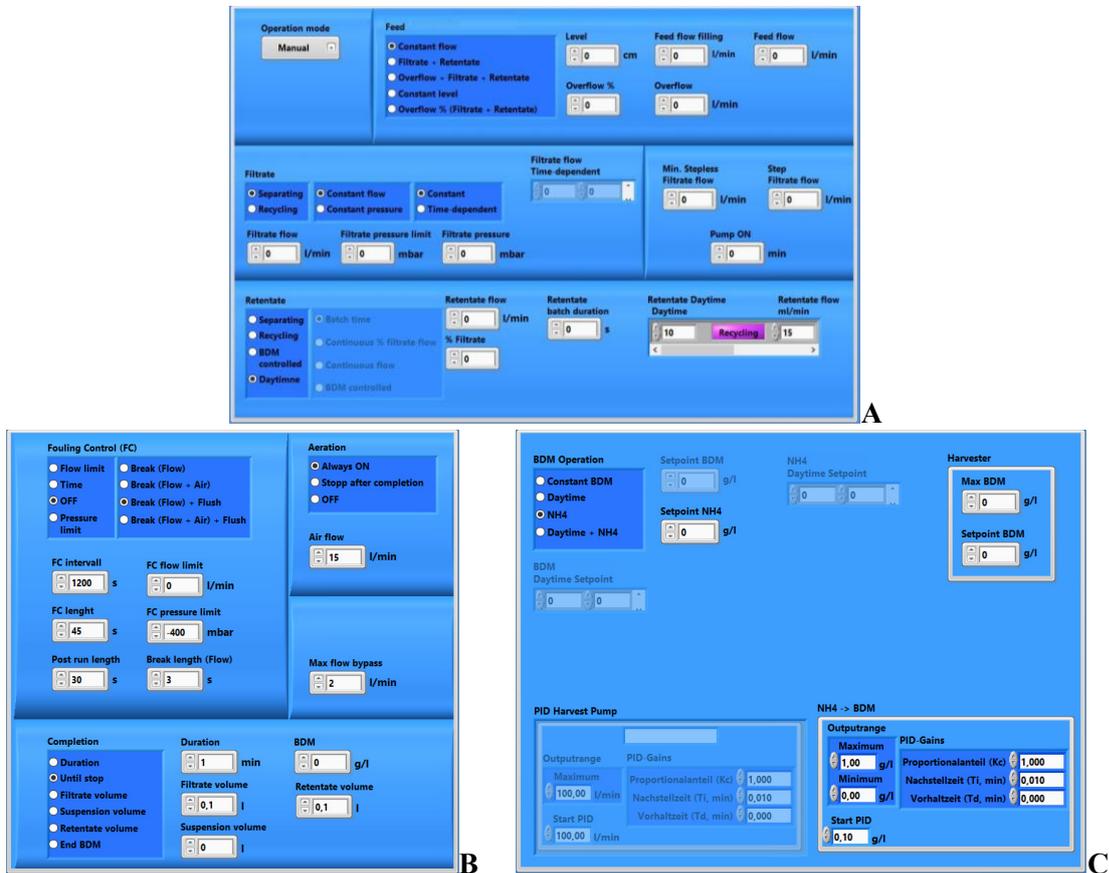


Abbildung 3-4: Prozessleitsystem *BioProCon*, welches für die Anwendung der Filtrationsanlage *Harvester* konzipiert wurde. Die Auswahlmöglichkeiten und Eingabefelder (A-C) erlauben eine individuelle Anpassung der Funktionen der Anlage an die Bedürfnisse des Prozesses. Für bestimmte Funktionsweisen inaktive Felder sind ausgegraut.

Im laufenden Betrieb sind die in den *Harvester* ein- und austretenden Ströme automatisiert geregelt: Die zu trennende Suspension kann so in die Anlage eingebracht werden, dass diese alle austretenden Ströme ausgleicht (konstanter Volumenstrom, Abbildung 3-4 A), oder aber ein konstanter Füllstand eingestellt wird (angepasster Volumenstrom, Abbildung 3-4 A). Beide Funktionen dienen auch zur Vermeidung von Fehlfunktionen an der Anlage (z.B. Leer-Laufen). Zur Erzeugung des Permeat-Fluxes kann zwischen den Betriebsweisen „konstanter Flux“ und „konstanter TMP“ gewählt werden (Abbildung 3-4 A). Die jeweils benötigten Sollwerte für Permeat-Flux und TMP sind in entsprechenden Eingabefeldern vorzugeben. In beiden Modi ist ein zeitgesteuerter Betrieb möglich, wobei die gewünschten Sollwerte im Tagesverlauf (24 h) beliebig detailliert in tabellarischer Form eingegeben werden können. Aufgrund der hohen Leistungsfähigkeit der Membran sowie der Konstruktion der Anlage (hydrostatische Wassersäule über der Membran) sind konstante Permeat-Flüsse unterhalb von  $\sim 9 \text{ L} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$  nicht realisier-

bar. Um dennoch kleine Permeat-Flüsse einstellen zu können, findet die Filtration entsprechend des eingestellten Grenzwert-Fluxes diskontinuierlich statt. Für eine vom Experimentator definierte Zeit wird mit einem ebenfalls vorgegebenen Permeat-Flux filtriert, um im Mittel den angegebenen Sollwert zu erreichen.

Das Retentat kann als konstanter Fluss mit einem vorgegebenen Sollwert eingestellt werden (Abbildung 3-4 A). Dieser Sollwert ist entweder als fester Wert oder aber als prozentualer Anteil des Filtrat-Flux definiert. Auch die Ernte der aufkonzentrierten Algensuspension ist im zeitgesteuerten Betrieb möglich, wobei die gewünschten Sollwerte für den Retentat-Fluss im Tagesverlauf (24 h) beliebig detailliert in tabellarischer Form eingegeben werden können (Abbildung 3-4 A). Sowohl der Permeat- als auch der Retentat-Flux können entweder zurück in das Vorlagegefäß beziehungsweise den Photobioreaktor geleitet oder aber aus dem System genommen werden.

Weiterhin ist es möglich, die Biomassekonzentration im Vorlagegefäß beziehungsweise den Photobioreaktor durch Rückführung von Retentat zu beeinflussen (Abbildung 3-4 A). Diese Funktion ist hauptsächlich bei Kopplung des *Harvesters* an einen Photobioreaktor im Pilotmaßstab vorgesehen, welcher zur Aufbereitung von Abwasser eingesetzt wird. Bei dieser Betriebsweise sind Werte für die Soll- sowie maximale Konzentration der Biomasse in der Trennkammer des *Harvesters* vorzugeben (Abbildung 3-4 C). Oberhalb des maximalen Wertes der Biomassekonzentration ist aufgrund zu hohen Membran-Fouling kein stabiler Betrieb mehr möglich, weshalb automatisch das Abernten der Zellen zur Reduktion der Biomassekonzentration eingeleitet wird. Mittels der Eingaben wird zudem der benötigte Retentat-Volumenstrom gemäß einer Massenbilanzierung vom Programm berechnet und automatisch an die Retentat-Pumpe weitergegeben. Prinzipiell sind zwei Betriebsweisen vorgesehen: Zunächst kann eine konstante Biomassekonzentration im Bioreaktor vorgegeben werden, welche bei Bedarf zeitgesteuert eingestellt werden kann, wobei die jeweiligen Sollwerte im Tagesverlauf (24 h) beliebig detailliert in tabellarischer Form einzugeben sind (Abbildung 3-4 C). Des Weiteren ist bei Einbau einer Leitfähigkeits- oder Ammoniumsonde eine Ziel-Ionenkonzentration im Photobioreaktor unterhalb eines eingegebenen Schwellenwertes realisierbar. In diesem Modus wird die Zellrückführung bei Überschreiten des Schwellenwertes gemäß den Regelparametern gestartet, bis ein Wert unterhalb des Sollwertes erreicht wird. Eine entsprechende Sonde war im Standardbetrieb des *Harvesters* für die Experimente der vorliegenden Arbeit allerdings nicht eingebaut.

Zur Reduktion des Membran-Fouling (Abbildung 3-4 B) kann das Membranmodul mittels eines gewünschten Luftvolumenstroms belüftet werden. Periodisches Rückspülen nach einer gewünschten Zeit, bei Unterschreiten eines festgelegten Limits des Permeat-Flux oder überschreiten eines vorgegebenen Filtrationsdrucks kann automatisiert ausgelöst werden. Verschiedene Modi für das Pausieren der Filtration (mit/ohne Rückspülen oder Belüftung) sind zudem realisierbar.

### 3.1.1.4 Energiebedarf

Zur Bewertung der Eignung einer Anlage für eine gewünschte Anwendung im Pilot- oder industriellen Maßstab wird unter anderem der Energiebedarf als Kriterium herangezogen. Nicht nur aus ökonomischen, sondern auch aus ökologischen Gesichtspunkten ist ein möglichst geringer Energieverbrauch wünschenswert. Für Abtrennprozesse wie der Filtration, wird der Energiebedarf pro kg geernteter Biomasse  $E_w$  in der Einheit  $\text{kJ}\cdot\text{kg}^{-3}$  beziehungsweise  $\text{kWh}\cdot\text{kg}^{-3}$  sowie pro  $\text{m}^3$  erzeugtem Permeat  $E_v$  in der Einheit  $\text{kJ}\cdot\text{m}^{-3}$  beziehungsweise  $\text{kWh}\cdot\text{m}^{-3}$  zur Beurteilung herangezogen. Mittels dieser Größen können verschiedene Aufbereitungsverfahren untereinander verglichen, sowie der notwendige Energieaufwand für eine konkrete Aufgabenteilung bestimmt werden. Die Berechnung des Energiebedarfs der Filtrationsanlage *Harvester* wird hauptsächlich durch den Verbrauch der Pumpen der ein- und austretenden Ströme (Ausgangssuspension (Feed-Pumpe), Permeat (Permeat-Pumpe) sowie Retentat (Ernte-Pumpe) sowie der Membranbelüftung bestimmt.

Für die beiden eingesetzten Peristaltikpumpen (Ausgangssuspension und Retentat) kann die theoretische Förderleistung  $P_{P,\text{th}}$  nach Gleichung (3.1) bestimmt werden, wobei  $F$  für den entsprechenden Fluss,  $\rho$  für die Dichte der geförderten Suspension,  $g$  für die Erdbeschleunigung und  $h$  für die Förderhöhe steht.

$$P_{P,\text{th}} = F \cdot \rho \cdot g \cdot h \quad (3.1)$$

Die theoretische Förderleistung der Zahnradpumpe zur Erzeugung eines Permeat-Fluxes ( $P_{P,\text{th,Permeat}}$ ) wird über den eingestellten Permeat-Flux  $F$  sowie der Druckdifferenz  $\Delta p$  zu beiden Seiten der Membran ermittelt (Gleichung (3.2)).

$$P_{P,\text{th,Permeat}} = F \cdot \Delta p \quad (3.2)$$

Über einen pumpenspezifischen Wirkungsgrad  $\eta_{\text{Pumpe}}$  kann der tatsächliche Energiebedarf der Pumpen  $P_P$  nach Gleichung (3.3) bestimmt werden.

$$P_P = \frac{P_{P,\text{th}}}{\eta_{\text{Pumpe}}} \quad (3.3)$$

Die zur Belüftung der Membranfasern erforderliche Energie  $P_{\text{air}}$  wurde mittels der Belüftungsrate ( $F_{\text{air}}$ ) in  $\text{m}^3\cdot\text{s}^{-1}$  sowie des hydrostatischen Drucks  $p_{\text{hydro}}$  der Wassersäule oberhalb des Gasaustritts nach Gleichung (3.4) berechnet.

$$P_{\text{air}} = F_{\text{air}} \cdot p_{\text{hydro}} \quad (3.4)$$

Der Energiebedarf ergibt sich als Summe der einzelnen, genannten Verbraucher. Nachstehende Tabelle fasst die benötigten Betriebs- und Anlagenparameter zur Berechnung des Energiebedarfs des *Harvesters* zusammen. Der Energiebedarf von Feed- und Retentat-Pumpe hängt von den Gegebenheiten des Einsatzortes der Filtrationsanlage ab, da deren Positionen die benötigte Förderhöhe bestimmen. Durch geschickte Anordnung des *Harvesters* kann beispielsweise der Energieeintrag durch die Feed-Pumpe gesenkt werden. Die notwendige Energie zur Erzeugung des Permeat-Flusses beeinflusst den gesamten Energiebedarf des *Harvesters* maßgeblich und

stellt damit ortsunabhängig die ausschlaggebende Energiesenke dar. Der Wirkungsgrad aller Pumpen wurde exemplarisch auf 0,7 festgelegt, da dieser in der Regel zwischen 0,6-0,8 schwankt und für die Gesamtbetrachtung der Anlagenleistung ausreichend genau ist. Der Energiebedarf der Belüftung ist vergleichsweise sehr gering (Tabelle 3-1) und damit vernachlässigbar.

Tabelle 3-1: Betriebs- und Anlagenparameter zur Ermittlung des Energiebedarfes der Filtrationsanlage *Harvester* im Pilotmaßstab. Zur Berechnung wurden eine Förderhöhe  $h$  von 1,22 m sowie die Dichte von Wasser ( $1000 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ ) angenommen.

<b>Belüftungsrate Membranfasern</b>	<b>Membranfläche</b>	<b>Permeat-Flux</b>	<b>TMP</b>	<b>Feed-Flux</b>
1,25 vvm $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$	1,31 $\text{m}^2$	19,5 $\text{L} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ $7,1 \cdot 10^{-6} \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$	13635 Pa	100 $\text{m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ $2,8 \cdot 10^{-2} \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$
<b><math>P_{P,\text{th,Permeat}}</math> (<math>\text{kJ}\cdot\text{s}^{-1}</math>)</b>	<b><math>P_{P,\text{th,Feed}}</math> (<math>\text{kJ}\cdot\text{s}^{-1}</math>)</b>	<b><math>P_{P,\text{th,Retentat}}</math> (<math>\text{kJ}\cdot\text{s}^{-1}</math>)</b>	<b><math>\eta_{\text{Pumpe}}</math> (alle)</b>	<b><math>P_a</math> (<math>\text{kJ}\cdot\text{s}^{-1}</math>)</b>
0,303	0,332	0,023	0,70	$1,194 \cdot 10^{-3}$

Der Energiebedarf des *Harvesters* kann für verschiedene Szenarien bezüglich Biomassekonzentrationen (Start/Ende) beziehungsweise volumetrische Reduktionsfaktoren und Konzentrationsfaktoren der zu filtrierenden Biomassesuspension bestimmt werden. Der hierfür festgelegte Permeat-Flux entspricht 85 % des kritischen Flux repräsentativer Biomassekonzentrationen und ist aus Vorversuchen bekannt. Entsprechend wurde ein TMP von 136,4 mbar ermittelt, welcher zur Aufrechterhaltung dieses Flux notwendig ist.

Die Ergebnisse einer solchen Berechnung wurden in Form eines wissenschaftlichen Papers (DOI: 10.1002/elsc.202100052) veröffentlicht (siehe Literatur Anhang 7.3). Die wichtigsten Aspekte sind im Folgenden zusammengefasst: Für verschiedene virtuelle Szenarien wurde der Energiebedarf des *Harvesters* quantifiziert. Eine einstufige Aufarbeitung einer Mikroalgensuspension von beispielsweise 2 auf  $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  Biomasse verbraucht lediglich  $1,01 \cdot 10^{-3} \text{ kWh}$  pro  $\text{m}^3$  Permeat beziehungsweise  $4,99 \cdot 10^{-3} \text{ kWh}$  pro kg Biomasse im Retentat. Für ein fiktives Szenario der kontinuierlichen Aufarbeitung von  $100 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$  Algensuspension einer Ausgangskonzentration von  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  zu einer End-Konzentration von  $250 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  in einem zweistufigen Prozess aus Zentrifugation und Filtration, kann der Einsatz des *Harvesters* den Energiebedarf um bis zu 99 % senken, verglichen mit einer einstufigen Zentrifugation. Bei einer Anwendung des Prinzips des *Harvesters* im großtechnischen und/oder Langzeitbetrieb können konstruktive Optimierungen den Leistungsbedarf der Permeat-Pumpe weiter reduzieren und die Anlage damit ökonomisch und ökologisch weiter optimieren.

## 3.1.2 Filtrationsanlage *Mini-Harvester* im Labormaßstab

### 3.1.2.1 Konzeption, Geometrie und Betrieb

#### Anforderungen an die Maßstabsverkleinerung

Parallel zur Filtrationsanlage *Harvester* im Pilotmaßstab wurde der sogenannte *Mini-Harvester* im Labormaßstab entwickelt. Die wesentlich kleinere Filtrationseinheit sollte an die vorhandenen 2 L-Photobioreaktoren (*BioEngineering*, siehe Kapitel 2.5) koppelbar sein. Der Einsatz im Laborbetrieb mit kleineren Volumina verspricht neben der besseren Kontrollierbarkeit der Bedingungen auch eine einfachere Umsetzung. Für den Scale-Down wurde ein Anlagenvolumen zwischen 100-200 mL vorgegeben und ein Skalierungsfaktor SF zwischen *Harvester* und *Mini-Harvester* von 100 festgelegt (Gleichung (3.5)).

$$SF = \frac{V_{\text{Permeat}}}{m^2_{\text{Membran}} \cdot h \cdot \text{bar}} \quad (3.5)$$

#### Aufbau des *Mini-Harvesters*

Der *Mini-Harvester* besteht im Wesentlichen aus einem durchsichtigen Plexiglasrohr mit einem Volumen von circa 100 mL (Abbildung 3-5). Am oberen Ende des Rohres ist ein Deckel mit einem Anschluss für das Einbringen der zu filtrierenden Suspension mittels einer Pumpe angebracht. Seitlich am Rohr befindet sich eine Überlauf-Konstruktion, welche einen konstanten Füllstand ohne externe Regelung ermöglicht. Am unteren Ende kann die aufkonzentrierte zellhaltige Suspension (Retentat) über einen Anschluss abgenommen werden. Der durch die Flüssigkeitssäule im laufenden Betrieb entstehende hydrostatische Druck erlaubt einen passiven Austrag des Retentats auch ohne Abpumpen. Der untere Abschluss des Rohres besteht aus dem sogenannten Faserhalter und einem Deckel. Im Faserhalter sind kreisförmig zwölf PVDF-Membranhohlfasern eingeklebt, welche den Auslass der Membranbelüftung ( $\varnothing$  3 mm) umschließen. Die Belüftung der Membranfasern erfolgt mit Druckluft. Die Größenordnung des Volumenstromes ist in Anlehnung an die Pilotanlage *Harvester* gewählt (konstanter Gasvolumenstrom pro Volumen der Filtrationskammer beider Anlagen). Ein Temperatursensor kann mittig am Plexiglasrohr des *Mini-Harvesters* angebracht, sowie Füllstandssensoren an verschiedenen Positionen des Rohrs montiert werden.

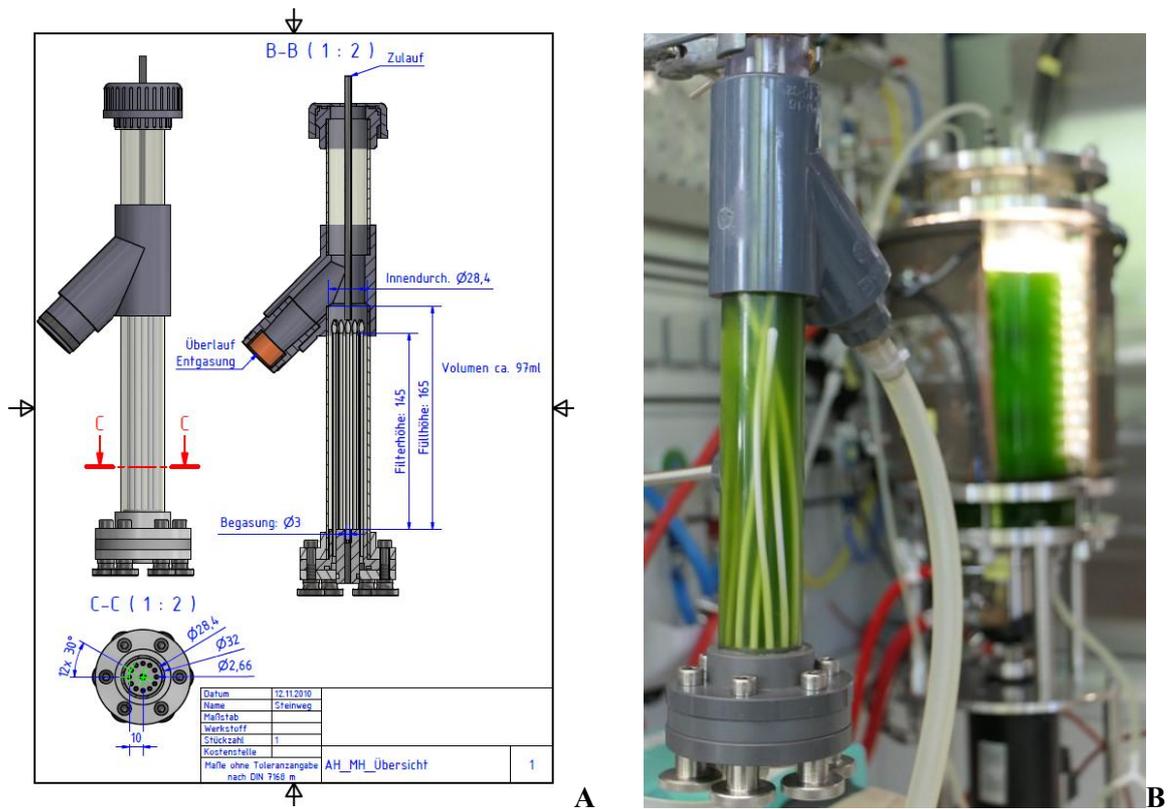


Abbildung 3-5: Technische Zeichnung (A) und Fotografie (B) der Filtrationsanlage *Mini-Harvester*. Der *Mini-Harvester* ist konzipiert als Plexiglasrohr, in welchem die Membranfasern kreisförmig um den Auslass der Belüftung angeordnet sind. Eine Überlaufkonstruktion garantiert einen konstanten Füllstand, am oberen Teil wird die zu filtrierende Ausgangssuspension eingebracht, das aufkonzentrierte Retentat wird am unteren Ende entnommen. Quelle: institutsinterne Zeichnung und Aufnahme.

Analog zum *Harvester* wird das Permeat an der Innenseite der Fasern gesammelt. Die Triebkraft für die Filtration wird über einen permeatseitigen Unterdruck realisiert. Hierfür wird eine Membranpumpe (Vakuumpumpe) eingesetzt, wodurch es zu einem Ansaugen des Permeats kommt. Der angelegte Transmembrandruck (TMP) wird über ein Manometer angezeigt. Über eine Waage wird die Menge an Permeat pro Zeiteinheit erfasst und kann in einen Permeat-Flux umgerechnet werden (vgl. Abschnitt 2.7.1). Je nach Bedarf kann die Länge der Membranfasern, welche wiederum die zur Verfügung stehende Membranfläche bestimmt, an den Versuchsaufbau angepasst werden. Insgesamt stehen zehn *Mini-Harvester* zur Verfügung, wodurch eine Parallelisierung möglich ist. Zudem erlaubt der modulare Aufbau ein flexibles Austauschen des Faserhalters, damit ist ein Test verschiedener Membranmaterialien ohne großen Aufwand realisierbar.

#### Konfigurationen des *Mini-Harvesters*:

Die Filtrationsanlage *Mini-Harvester* im Labormaßstab wurde institutsintern für verschiedene Anwendungen entwickelt. Gekoppelt an die vorhandene Photobioreaktortechnologie können diverse Versuchsaufbauten realisiert werden. Im Laufe der Zeit fand eine Weiterentwicklung der Anlage (Peripherie) sowie der Steuerung (Automatisierung) statt, im Folgenden sind daher zwei Installationen im Detail beschrieben: (1) Vereinfachter Aufbau (Kapitel 3.1.2.2) sowie (2)

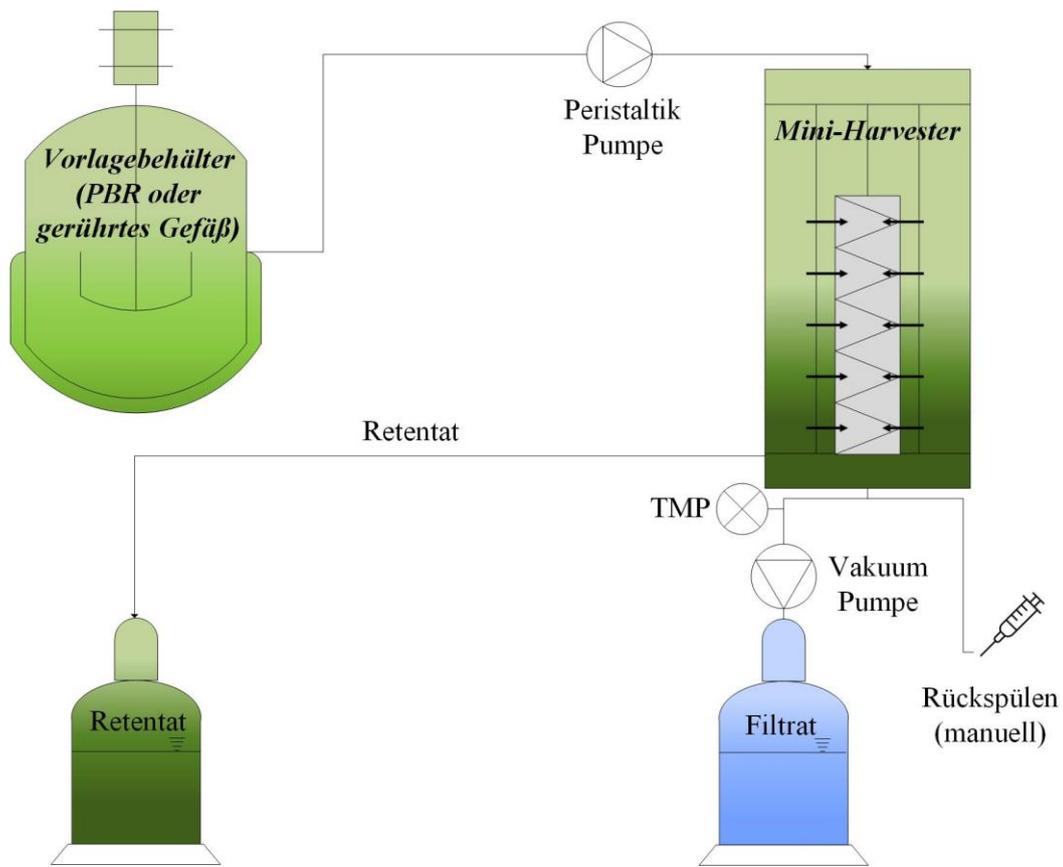
Automatisierter Aufbau (Kapitel 3.1.2.3). Beide wurden für Experimente der vorliegenden Arbeit eingesetzt.

### **3.1.2.2 Vereinfachter Aufbau *Mini-Harvester***

Der im Folgenden beschriebene vereinfachte Aufbau der Filtrationsanlage *Mini-Harvester* im Labormaßstab zeichnet sich durch seine Robustheit mit geringer Fehleranfälligkeit aus. Die Einfachheit bedingt allerdings, dass lediglich die Betriebsweise „konstanter Transmembrandruck“ realisiert werden kann. Zudem sind die (automatisierte) Steuerung der Anlage sowie die Datenaufzeichnung limitiert. Der *Mini-Harvester* im vereinfachten Aufbau wurde für Experimente am Bioverfahrenstechnik Institut des KIT sowie in Kooperation mit Projektpartnern der Jacobs University in Bremen eingesetzt und dort vor Ort installiert. Einen Überblick dieser Experimente inklusive Versuchsparemeter gibt

Tabelle 3-2. Das Fließbild der Membranfiltrationsanlage *Mini-Harvester* im vereinfachten Aufbau ist in Abbildung 3-6 dargestellt.

Die partikelbeladene Ausgangssuspension (Feed) wird aus einem Vorlagebehälter (Gefäß oder Photobioreaktor) über eine Peristaltikpumpe mit einem konstanten Volumenstrom in den *Mini-Harvester* eingebracht. Im vereinfachten Aufbau ist die Triebkraft der Filtration ein von der Vakuumpumpe erzeugter, konstanter Transmembrandruck. Eine Waage erfasst die Menge an erzeugtem Permeat, welche im Anschluss in einen Permeat-Flux umgerechnet werden kann. Über das Öffnen eines Handventils kann die aufkonzentrierte Suspension (Retentat) abgenommen werden. Membran-Fouling wird durch permanente, konstante Belüftung der Fasern mit Druckluft sowie manuelles Rückspülen mit VE-Wasser reduziert. Das Rückspülen erfolgt periodisch mittels einer Spritze bei einem Druck von 0,2 bar, welcher über ein Manometer kontrolliert wird. Die Dauer sowie das eingebrachte Wasservolumen sind jeweils zu dokumentieren. Im vereinfachten Aufbau war keine Temperatursonde am *Mini-Harvester* eingebaut. Sofern nicht explizit anderweitig deklariert fand zur Messung der Temperatur im Feed die Temperatursonde des Photobioreaktorsystems Einsatz (*BioEngineering*, siehe Kapitel 2.5).



A



B

Abbildung 3-6: Experimenteller Aufbau der Filtrationsanlage *Mini-Harvester* im Labormaßstab im vereinfachten Aufbau (A R&I-Fließschema, B Foto). Die Zufuhr der zu trennenden, zellhaltigen Suspension erfolgt über eine Peristaltikpumpe, eine Vakuumpumpe erzeugt den zur Filtration notwendigen TMP, die aufkonzentrierte Zellsuspension kann manuell entnommen werden. Die Quantifizierung des Filtrat-Flux erfolgt via Wägung. Quelle: eigene Zeichnung und Aufnahme.

Vor jedem experimentellen Einsatz des *Mini-Harvesters* wurde die Filtrationsanlage gemäß des Reinigungsprotokolls (siehe Kapitel 8.3.3) gesäubert.

Tabelle 3-2: Überblick der Experimente sowie Parameter, welche mit dem *Mini-Harvester* im vereinfachten Aufbau durchgeführt wurden. Z: Nummer des Filtrationszyklus bestehend aus der Dauer der Filtration und des Rückspülens. \* Messung mittels eines Infrarotthermometers (TFI-250, Ebro, Deutschland).

Versuchsbeschreibung	TMP (mbar)	Membran- fläche (m <sup>2</sup> )	Druck (bar)	Rückspülen		Aufgenommene Prozessparameter und Beprobungsstellen	Referenz- kapitel
				Dauer (sek)	Frequenz (min)		
Untersuchung der Anti- Fouling-Maßnahme Rück- spülen	200	0,0221	0,10	15	15	Temperatur: Feed pH und Leitfähigkeit: Feed OD <sub>750</sub> : Feed, Retentat, Permeat BTM: Feed	3.3.1
		0,0205	bis	30	30		
		0,0250	0,15	60			
		0,0233		90			
Fraktionierte Filtration Algensuspension - Wachstumsphase	200	0,0108	0,1	60	15	Temperatur: Feed OD <sub>750</sub> : Feed, Retentat, Permeat BTM: Feed	3.4.1
Fraktionierte Filtration Algensuspension - Algenspezies	100	0,016	0,2	45	10 (Z 1-3) 5 (Z 4-6)	Temperatur*: Feed, Retentat, Permeat pH und Leitfähigkeit: Feed OD <sub>750</sub> : Feed, Retentat, Permeat BTM: Feed	3.4.2

### 3.1.2.3 Automatisierter Aufbau *Mini-Harvester*

Das primäre Ziel der Erweiterung und Automatisierung des vereinfachten Aufbaues des *Mini-Harvesters* war die Möglichkeit zur Kopplung an das vorhandene Photobioreaktor-System (Kapitel 2.5) zur Installation eines Algen-Membran-Photobioreaktors. Zur Ausführung einer kontinuierlichen Kultivierung mit Zellrückführung war die Realisierung der Betriebsweise „konstanter Filtrat-Flux“ als sekundäres Ziel notwendig. Abbildung 3-7 zeigt das R&I-Fließbild der Erweiterung des *Mini-Harvesters* im automatisierten Aufbau. Alle gemessenen Prozessparameter wurden prozessbegleitend für die Visualisierung, Berechnungen und die Regelung im Prozessleitsystem zur Verfügung gestellt und zudem aufgezeichnet.

Zur Erzeugung der Triebkraft der Filtration evakuiert eine Vakuumpumpe einen Vakuumspeicher mit einem Fassungsvermögen von 5 L. Der Deckel dieses Gefäßes ist mit Anschlüssen sowie einem Manometer zur manuellen Druckkontrolle präpariert. Daran angeschlossen ist ein (bei Parallelisierung der *Mini-Harvester* mehrere) Vakuumregler. Der Regler ermöglicht die Realisierung der Betriebsweisen „konstanter Filtrat-Flux“ und „konstanter TMP“ und regelt das Vakuum im Permeat-Behälter, dessen Gewicht über Wägung festgestellt wird. Das Permeat wird in der Permeat-Flasche gesammelt und die Menge an Filtrat über eine Waage erfasst. Mittels der temperaturabhängigen Dichte von Wasser wird dieses Signal in der Software in einen Permeat-Fluss in der Einheit Volumen pro Zeit umgerechnet und geht als Istwert in die Regelung ein. Eine Mehrkanal-Peristaltikpumpe bringt die zu filtrierende Suspension (Feed) in den *Mini-Harvester* ein beziehungsweise entnimmt die aufkonzentrierte Suspension (Retentat). Die Membranfasern können über einen steuerbaren Massendurchflussregler mit einem gewünschten Volumenstrom an Druckluft belüftet werden. Das Rückspülen erfolgt automatisiert, wobei der *Mini-Harvester* über einen einstellbaren Druckminderer (0,2 bar) an die VE-Wasserleitung angeschlossen ist. Ein dazwischen geschaltetes Ventil öffnet automatisch, die Dauer und Frequenz des Rückspülens können dabei vom Experimentator vorgegeben werden. Die Automatisierung der Anlage ist im Folgenden (Kapitel 3.1.2.4) im Detail beschrieben. Zur Realisierung des Versuchsaufbaus eines Algen Membran-Photobioreaktors wurde der *Mini-Harvester* im automatisierten Betrieb an die am Institut vorhandene Photobioreaktortechnologie im 2 L Maßstab gekoppelt (siehe Kapitel 2.5.4).

Vor jedem experimentellen Einsatz des *Mini-Harvesters* wurde die Filtrationsanlage gemäß des Reinigungsprotokolls (siehe Kapitel 8.3.3) gesäubert.

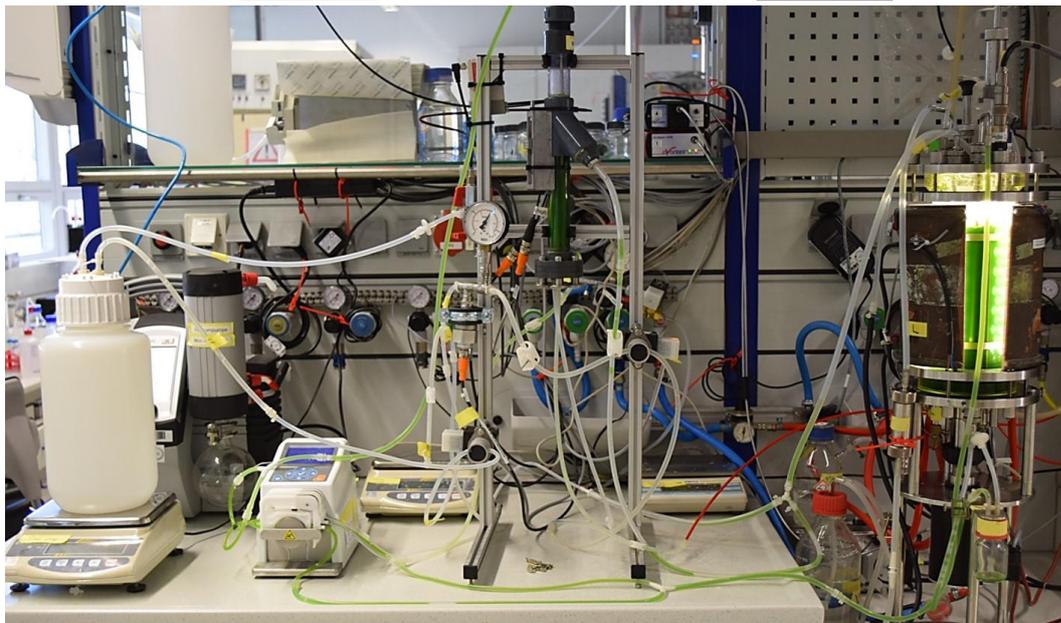
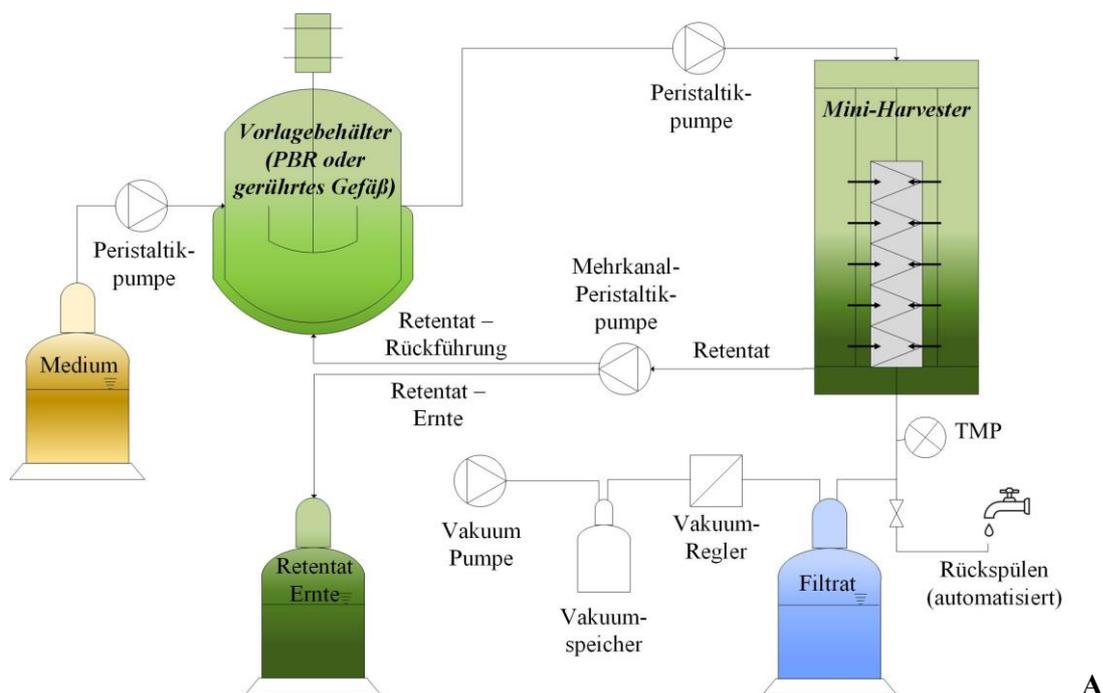


Abbildung 3-7: Experimenteller Aufbau der Ultrafiltrationsanlage *Mini-Harvester* im Labormaßstab im automatisierten Aufbau (A R&I-Fließschema, B Foto). Die Zufuhr der zu trennenden, zellhaltigen Suspension sowie der Abfluss des Retentats erfolgt automatisiert über eine Peristaltikpumpe. Eine an einen Vakuumregler gekoppelte Vakuumpumpe erzeugt den Filtrat-Flux, die Quantifizierung des Filtrat-Flux erfolgt automatisiert via Wägung. Rückspülen und Membranbelüftung können ebenso automatisch gesteuert werden. Quelle: eigene Zeichnung und Aufnahme.

### 3.1.2.4 Automatisierung

Die Automatisierung der Filtrationsanlage *Mini-Harvester* ist eine Erweiterung des institutsintern entwickelten LabVIEW-basierten Programms *BioProCon*. Diese umfasst die Regelung der in den *Mini-Harvester* ein- und austretenden Ströme, die Belüftung der Membranfasern, das

Rückspülen der Membranfasern sowie die Erzeugung der Triebkraft der Filtration. Zudem können die Parameter zur online Berechnung der mittels Wägung quantifizierbaren Volumenströme eingestellt werden (Abbildung 3-8 B). Einige der in Abbildung 3-8 gezeigten Eingabefelder und Variablen dienen dem reibungslosen Betrieb der Anlage und umfassen beispielsweise Wartezeiten. Folgend sind daher lediglich die Kernpunkte der Automatisierung zusammengefasst.

Für die Zugabe des zu trennenden Materials (Feed) über die Feed-Pumpe sind zwei Betriebsweisen vorgesehen (Abbildung 3-8 B). Neben einem konstanten Volumenstrom kann der Feed-Strom außerdem als Summe der austretenden Ströme (Filtrat, Retentat und ggf. Überlaufstrom) definiert werden, um ein Absinken des Füllstandes zu verhindern. Die aufkonzentrierte Zellsuspension (Retentat) kann als konstanter Wert oder als prozentualer Wert des Filtrat-Flux eingestellt werden. Das Retentat (Abbildung 3-8 B) kann in das Vorlagegefäß zurückgeleitet und/oder in einem separaten Gefäß gesammelt werden. Der Menge des separierenden Erntestroms wird mittels Wägung quantifiziert und näherungsweise mittels der Dichte von Wasser in einen Volumenstrom umgerechnet. Durch den Einbau des Vakuumreglers können zwei Betriebsweisen bezüglich der Filtration realisiert werden: Neben einem konstanten TMP kann ein konstanter Filtrat-Flux erzeugt werden (Abbildung 3-8 A). Die Menge an Filtrat wird dabei über eine Waage online gemessen und im Programm über die temperaturabhängige Dichte von Wasser in einen Volumenstrom umgerechnet. Der eingebaute Temperatursensor gibt dabei die in Echtzeit gemessene Temperatur an. Ein Druckmessumformer misst den anliegenden Transmembrandruck, welcher automatisch aufgezeichnet wird.

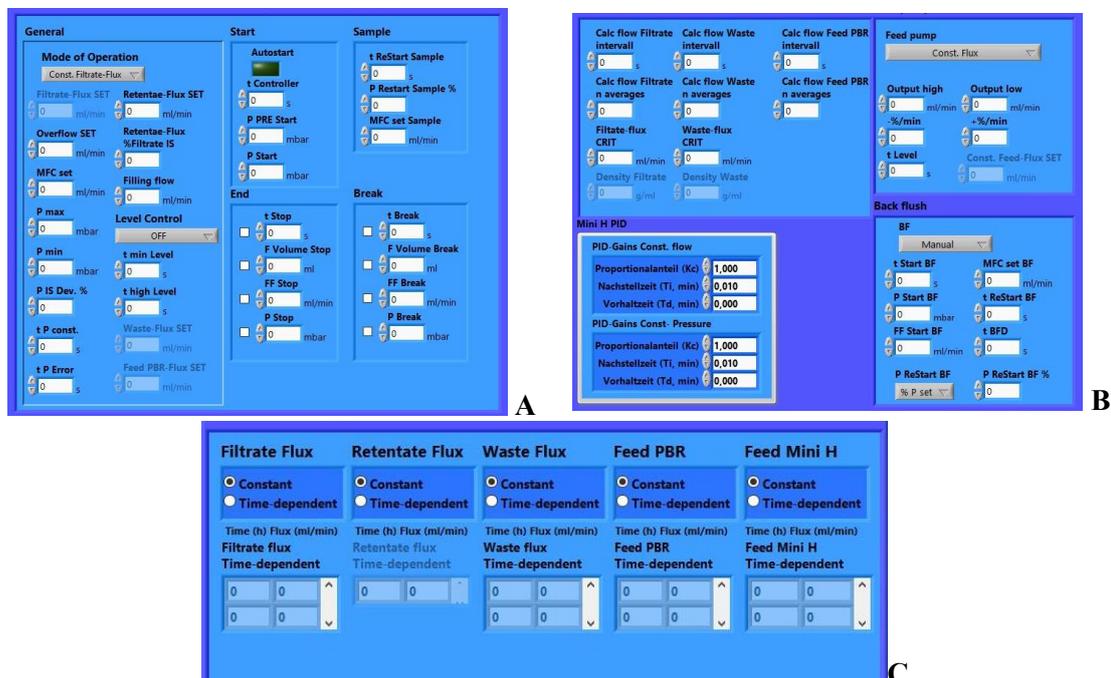


Abbildung 3-8: Prozessleitsystem *BioProCon*, welches für den automatisierten Betrieb der Filtrationsanlage *Mini-Harvester* konzipiert wurde. Aktuelle Prozessparameter können in einer Übersicht (nicht gezeigt) abgelesen werden. Die Auswahlmöglichkeiten und Eingabefelder (A-C) erlauben eine individuelle Anpassung der Funktionen der Anlage an die Bedürfnisse des Prozesses. Für bestimmte Funktionsweisen inaktive Felder sind ausgegraut.

Zur Reduktion von Membran-Fouling werden die Membranfasern mit VE-Wasser rückgespült (Abbildung 3-8 B). Das Rückspülen kann automatisiert bei Erreichen eines maximalen TMP, minimalen Filtrat-Flux oder dem Ablauf eines vorgegebenen Zeitintervalls initiiert werden. Zudem kann der Vorgang manuell eingeleitet werden. Zusätzlich zum Rückspülen werden die Membranfasern belüftet, der gewünschte Gasvolumenstrom wird mittels eines Massendurchflussreglers (MFC) geregelt und überwacht (Abbildung 3-8 A). Alle ein- und austretenden Ströme am *Mini-Harvester* sowie des ggf. gekoppelten Photobioreaktors können konstant beziehungsweise zeitgesteuert eingestellt werden (Abbildung 3-8 C). In letzterem Modus können die gewünschten Sollwerte in tabellarischer Form beliebig genau eingegeben werden. Um ein Leerlaufen des *Mini-Harvesters* zu vermeiden, werden zwei kapazitive Füllstandsensoren zur Regelung des Füllstandes eingesetzt (Abbildung 3-8 A). Die Signale dieser Sensoren passen bei Bedarf die Drehzahl der Feed-Pumpe an den Prozess an. Sensor 1 ist knapp oberhalb der Fasern angebracht und markiert den Mindestfüllstand (Fasern sind gerade mit Flüssigkeit bedeckt). Wird dieser Flüssigkeitsspiegel unterschritten, gibt die Software eine Erhöhung der Drehzahl nach einer internen Berechnung an die Feed-Pumpe weiter. Dieser neue Sollwert ist um einen Bruchteil des vom Experimentator eingegebenen Sollwertes erhöht, wobei die Zunahme der Drehzahl zeitabhängig ansteigt, bis der Sensor ein Erreichen des minimalen Füllstandes anzeigt. Der Betrag der Drehzahlerhöhung wird in einem Korrekturfaktor gespeichert und im weiteren Betrieb zum vom Experimentator vorgegebenen Sollwert der Feed-Pumpe addiert. Sensor 2 wird am Überlauf angebracht und zeigt damit an, ob ein Überlaufstrom erzeugt wird. Im Regler wird das Signal des Niveauschalters mit dem Sollzustand des Überlaufstroms (an/aus) verglichen und bei Bedarf die Drehzahl der Feed-Pumpe angepasst. Auch hier wird der Betrag der Veränderung der Pumpendrehzahl als Korrekturfaktor für den weiteren Verlauf des Versuches zum Sollwert addiert beziehungsweise abgezogen. Alle Drehzahlanpassungen werden also nacheinander addiert beziehungsweise subtrahiert. Bei Versuchsende wird der Korrekturfaktor auf null zurückgesetzt. Eine Begrenzung des Korrekturfaktors geschieht durch die Eingabe der minimalen und maximalen Geschwindigkeit der Feed-Pumpe. Um in der Betriebsweise „konstanter Filtrat-Flux“ die Einregelung am Start der Filtration beziehungsweise nach einer Probenentnahme zu verbessern, können ein Startdruck und eine Wartezeit vorgegeben werden (Abbildung 3-8 A).

## 3.2 Charakterisierung Membran

### 3.2.1 Spezifikation laut Hersteller

#### Aufbau des Membranmoduls

Das im *Harvester* eingesetzte Membranmodul Puron® Hollow Fiber Demo Rows ist ein Demonstrationsmodul der Firma Koch Membrane Systems im Labormaßstab (Abbildung 3-9 A & B) mit folgenden Abmessungen: reduzierte Höhe: ~440 mm, Breite: 348 mm, Tiefe: 92 mm. Es besteht aus drei Bündeln von PVDF Hohlfasern mit einem Durchmesser von ~75 mm. Pro Einheit sind je 228 Fasern angebracht, insgesamt beträgt die Zahl an Membranfasern also  $n_{\text{Fasern}} = 684$ . In der Mitte jedes Bündels ist der Gasauslass ( $\varnothing$  5 mm) angebracht, aus welchem die

Gasblasen zur Fouling-Reduktion entlang der Membranfasern austreten. Die Anschlüsse für Belüftung und zur Abnahme des Filtrates sind seitlich am Modul angebracht.

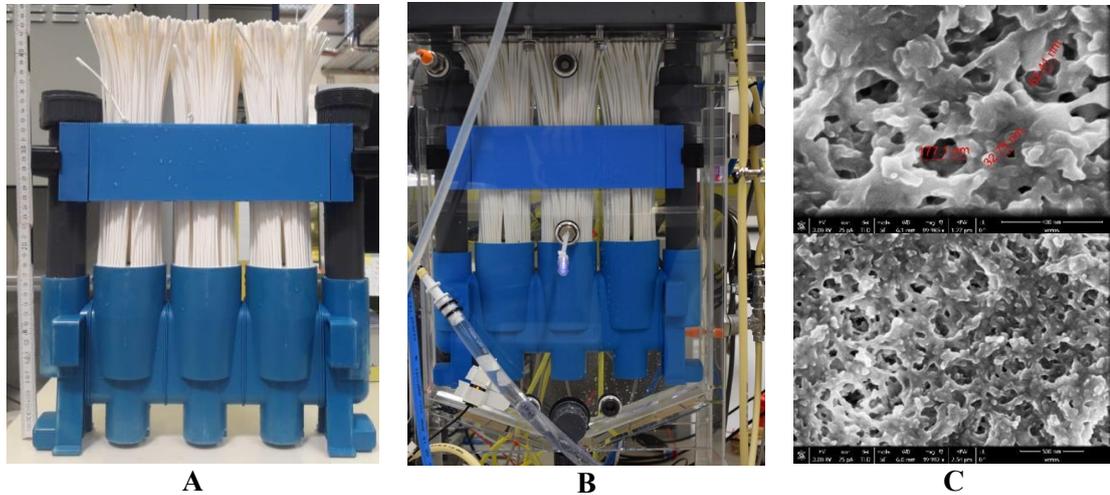


Abbildung 3-9: Für die Filtrationsanlage Harvester eingesetztes Membranmodul Puron® Hollow Fiber Demo Rows der Firma Koch Membrane Systems. A & B: Fotos, C: Rasterelektronenmikroskop (REM)-Aufnahmen der Membranfasern des Filtrationsmoduls. Quelle: eigene Aufnahmen (institutsintern und Projektpartner).

### Spezifikation des Membran-Materials

Das Membranmaterial (Abbildung 3-9 C) wird gemäß des Datenblattes des Moduls wie folgt spezifiziert:

- Material: firmeneigenes Polyvinylidenfluorid (PVDF)
- Nominale Porengröße: 0,03 µm
- Außendurchmesser  $d_{\text{Faser}}$ : 2,6 mm
- pH-Bereich: 2,0 - 10,5
- Temperatur-Bereich: 5 - 40 °C
- Max. TMP: ± 0,6 bar

Im Mittel beträgt die für die Filtration zur Verfügung stehende Membranlänge pro Faser  $l_{\text{Faser}} = 23,4 \pm 0,2$  cm, woraus nach Formel (3.6) eine Membranfläche  $A_M$  von 1,31 m<sup>2</sup> berechnet werden kann.

$$A_M = \pi \cdot d_{\text{Faser}} \cdot l_{\text{Faser}} \cdot n_{\text{Fasern}} \quad (3.6)$$

Für den *Mini-Harvester* wurden einzelne Fasern des Membranmoduls eingesetzt, welche vor dem Einkleben in den Faserhalter (Abbildung 3-10) auf die gewünschte Länge von ca. 10-12 cm zugeschnitten wurden. Die dabei generierte Membranfläche kann analog nach Gleichung (3.6) berechnet werden.

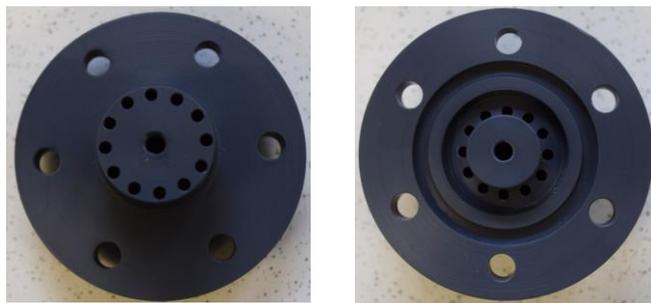


Abbildung 3-10: Faserhalter des *Mini-Harvesters* von vorne (links) und hinten (rechts). Um den Auslass der Belüftung (mittig) werden kreisförmig angeordnet 12 Hohlfasern eingeklebt. Im Reservoir (hinten) wird das Permeat gesammelt und abgesaugt. Quelle: eigene Aufnahmen.

### 3.2.2 Membranwiderstand und -permeabilität

Das kommerziell erhältliche Membranmodul Puron® Hollow Fiber Demo Rows wurde direkt nach dessen Erwerb mit vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) charakterisiert. Zunächst wurde der Widerstand der sauberen Membran  $R_M$  in Abhängigkeit des angelegten Transmembrandrucks ohne Membranbelüftung ermittelt (Abbildung 3-11). Nach Gleichung (2.19) (Darcy Gesetz, Kapitel 2.7.4.1) ist  $R_M$  eine Funktion des angelegten TMP, des resultierenden Filtrat-Fluxes sowie der dynamischen Viskosität  $\mu_T$  der zu filtrierenden Suspension. Die Temperaturabhängigkeit von  $\mu_T$  wurde bei der Berechnung von  $R_M$  für jeden Messpunkt durch eine Interpolation von Literaturdaten (VDI-Gesellschaft Verfahrenstechnik und Chemieingenieurwesen 2013) mittels der online gemessenen Temperatur in der Trennkammer berücksichtigt. Für das Membranmodul wurde eine Zunahme von  $R_M$  mit steigendem TMP ermittelt (Abbildung 3-11 A). Für poröse Ultrafiltrations (UF)-Membranen wurde von (Huisman et al. 1997) eine solche Drucksensitivität beschrieben. Durch die steigende Krafteinwirkung bei hohen TMPs werden die Poren der Membran zusammengedrückt, wodurch sich deren Widerstand erhöht. Eine empirische Gleichung für die Beziehung zwischen angelegtem TMP und resultierendem  $R_M$  kann daher für polymere Membranen allgemein beschrieben werden als:

$$R_M = R_{M,0} + v_c \cdot \text{TMP}^k \quad (3.7)$$

Der Faktor  $k$  ( $0,6 < k < 1,0$ ) beschreibt dabei den einheitenlosen Kompressibilitätsfaktor der Membran, welcher durch die Porosität des Membranmaterials sowie der Membran selbst definiert wird. Der Vorfaktor  $v_c$  wird als membranspezifische Konstante angegeben.  $R_{M,0}$  ist als Membranwiderstand ohne angelegten TMP zu verstehen, welcher in der Praxis nicht messbar ist. Die Interpolation der Messwerte in Abbildung 3-11 durch einen allometrischen Fit liefert folgende Gleichung (3.8) für den druckabhängigen Membranwiderstand ( $R^2 = 0,98$ ):

$$R_M = 4,135 \cdot 10^{11} + 2,004 \cdot 10^{10} \cdot \text{TMP}^{0,6648} \quad (3.8)$$

Der vergleichsweise geringe Kompressibilitätsfaktor von  $k = 0,6648$  deutet auf eine hohe Sensitivität der Membran gegenüber dem angelegten Druck hin, welche für neue Membranen üblich ist. In Übereinstimmung mit Huisman et al. 1997 ist eine erhöhte Druckempfindlichkeit bis

200 mbar messbar. Zudem kann eine mittlere Membranpermeabilität  $P_{W,mittel}$  für Wasser von  $515,66 \text{ L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{bar}^{-1}$  im Druckbereich zwischen 0 und  $\sim 300$  mbar ermittelt werden.

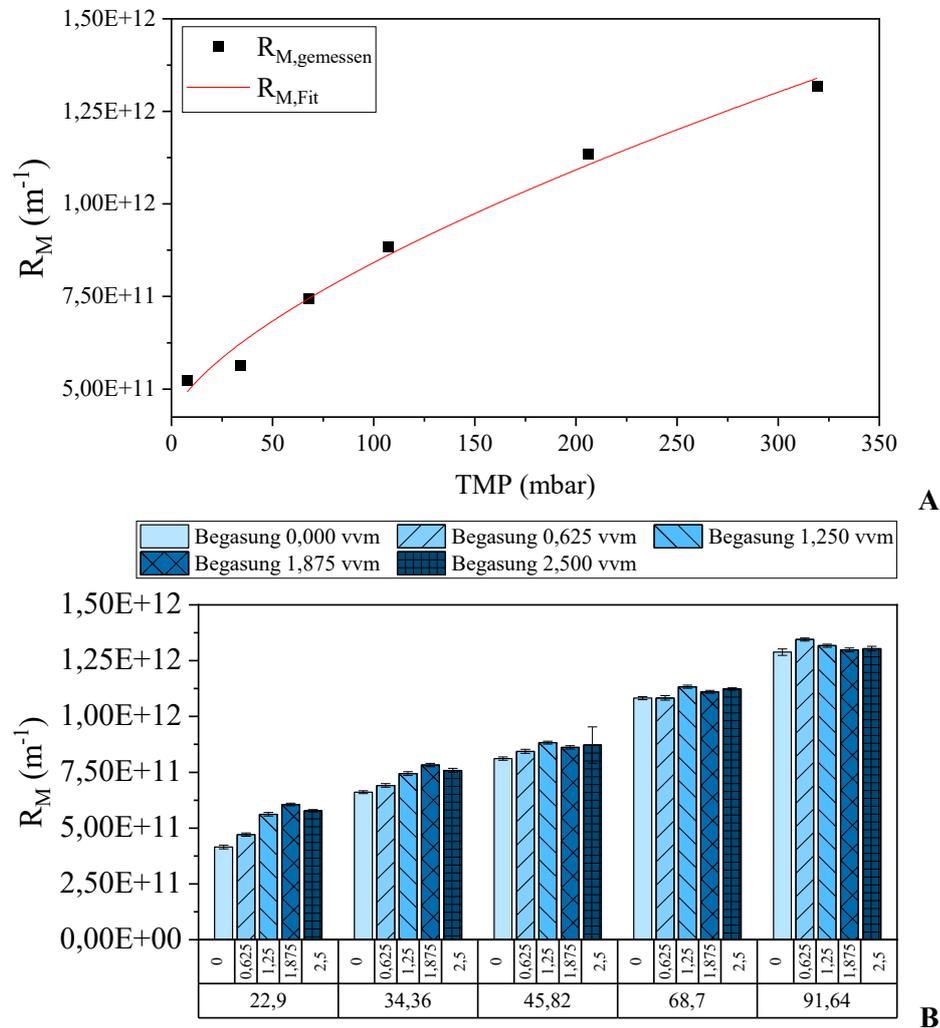


Abbildung 3-11: Widerstand der sauberen Membran  $R_M$  des Membranmoduls des *Harvesters* (A) Veränderung von  $R_M$  mit ansteigendem Transmembrandruck (TMP), die gemessenen Werte (schwarze Vierecke) werden durch einen allometrischen Fit (rote Linie, durchgeführt mit dem Programm OriginPro2020) angenähert bei  $R^2 = 0,98$ . (B) Gemessener Widerstand der sauberen Membran  $R_M$  in Abhängigkeit der eingestellten Membranbelüftung (0,000-2,500 vvm) für verschiedene Filtrat-Fluxe ( $22,9$ - $91,64 \text{ L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ) für VE-Wasser.

Um einen Einfluss der Membranbelüftung auf  $R_M$  auszuschließen, wurde dieser für verschiedene Belüftungsraten und Filtrat-Fluxe gemessen (Abbildung 3-11 B). Durch die Gasblasen wird zeitweise ein Flüssigkeitsvolumen an der Membranoberfläche verdrängt, wodurch es zu einer scheinbaren Verringerung der Permeabilität, einhergehend mit einer Erhöhung von  $R_M$  kommen kann. Dieser Effekt tritt lediglich bei geringen Filtrat-Fluxen ( $22,90$  und  $34,36 \text{ L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ) auf, hier ist eine Erhöhung von  $R_M$  mit zunehmender Belüftungsrate messbar. Für hohe Flüsse ( $> 45,82 \text{ L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ) ist keine eindeutige Tendenz zu beobachten, wobei die Schwankungen von

$R_M$  in Abhängigkeit der Belüftungsrate gering ausfallen. Alle Messdaten sowie die daraus berechneten Werte für  $R_M$  sowie  $Pe_w$  sind im Anhang in Tabelle 8-12 dargestellt.

Bei der Filtration ionenhaltiger Lösungen kommt es entlang der (geladenen) Membranoberfläche zur Ausbildung sogenannter elektrochemischer Doppelschichten. Diese sind definiert als Grenzschichten, an welchen sich elektrisch geladene Schichten gegenüberstehen und können auch bei der Filtration von Wasser entstehen. Wird die Lösung nun durch die Membranporen gepresst, kann es zu einer Verschiebung der Ionen von deren präferierten Positionen kommen. Dieser sogenannte elektroviskose Effekt führt zu einer scheinbaren Erhöhung der Viskosität der Flüssigkeit an der Membranoberfläche. Dadurch kommt es zur Ausbildung eines elektroviskosen Widerstands in den Poren der Membran, wodurch der Membranwiderstand scheinbar erhöht wird. Im Falle der Filtration von reinem Wasser bilden sich stark ausgeprägte Doppelschichten (Gouy-Chapman). Eine Zugabe von Salzen kann ab einem Grenzwert der Salzkonzentration eine Verringerung der Dicke der Doppelschicht, einhergehend mit einer Verringerung des Widerstandes für das passierende Wasser (Permeat), hervorrufen. (Huisman et al. 1997) Um auszuschließen, dass der beschriebene elektroviskose Effekt im vorliegenden Fall auftritt, wurde der Membranwiderstand analog zu den Versuchen mit VE-Wasser mit einer NaCl-Lösung zweier Konzentrationen (0,2 und 0,4 M) für zwei Belüftungsraten der Membranfasern (0,0 und 0,625 vvm) bestimmt.

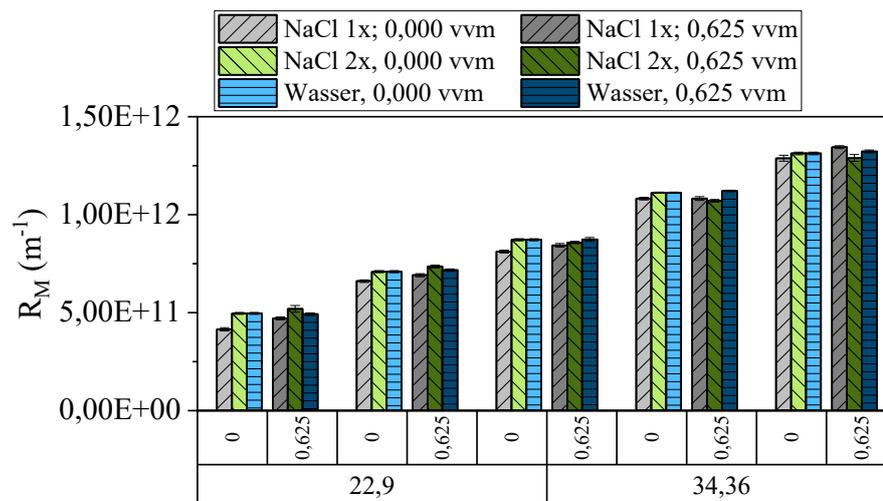


Abbildung 3-12: Gemessener Widerstand der sauberen Membran  $R_M$  des Membranmoduls des *Harvesters* in Abhängigkeit der eingestellten Membranbelüftung für ionenhaltige Lösungen und VE-Wasser. Getestet wurden die Belüftungsraten 0,000 und 0,625 vvm sowie NaCl-Lösungen zweier Konzentrationen (1x: 0,2 M, 2x: 0,4 M) bei einem konstanten Filtrat-Flux von 22,90 L·m<sup>-2</sup>·h<sup>-1</sup> sowie 34,36 L·m<sup>-2</sup>·h<sup>-1</sup>.

In Abbildung 3-12 ist der Membranwiderstand für zwei Belüftungsraten der Membranfasern (0,000 sowie 0,625 vvm) für VE-Wasser und NaCl-Lösungen zweier Konzentrationen (1x: 0,2 M, 2x: 0,4 M) dargestellt. Die Gehalte der Ionenlösungen wurden in Anlehnung an einschlägige Literatur ausgewählt (Huisman et al. 1997). Trotz der erhöhten Ionenstärke der beiden NaCl-Lösungen war keine merkliche Veränderung des  $R_M$  im Vergleich zu VE-Wasser messbar. Daher kann ausgeschlossen werden, dass der Membranwiderstand durch die Gouy-Chapman Doppelschichten signifikant beeinflusst wird. Die ermittelte Gleichung (3.8) für  $R_M$  in

Abhängigkeit des angelegten TMP kann also als für das eingesetzte Membranmodul allgemein gültig angenommen werden.

Auch für das Membranmodul des *Mini-Harvesters* (Faserhalter) wurde eine Charakterisierung mit VE-Wasser durchgeführt. Neben dem Einfluss der Membranbelüftung (0,0 und 20,0 vvm) wurde zusätzlich der Temperatureinfluss (20, 30 und 35 °C) auf den erzielbaren Filtrat-Flux bei Variation des TMP (13, 113, 213 und 263 mbar) quantifiziert (Abbildung 3-13).

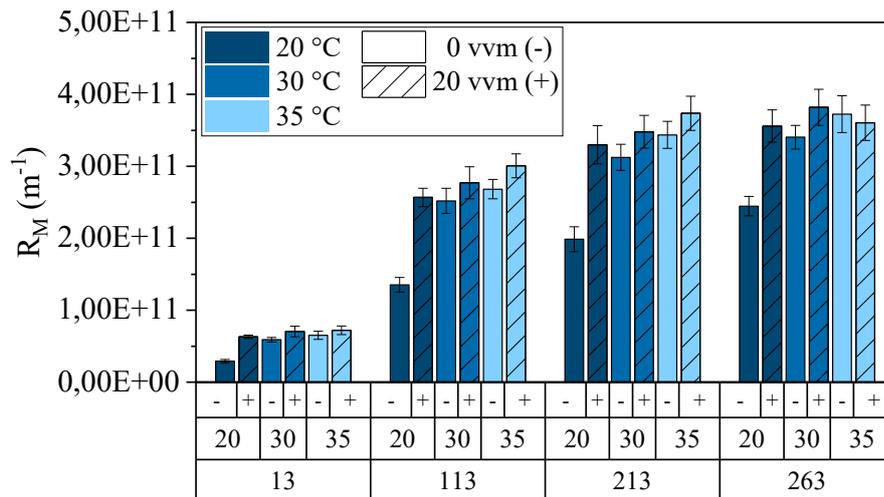


Abbildung 3-13: Gemessener Widerstand der sauberen Membran  $R_M$  des Membranmoduls des *Mini-Harvesters*.  $R_M$  wurde in Abhängigkeit der eingestellten Membranbelüftung (0 vvm (-) und 20 vvm (+)) und Temperatur (20, 20 und 35 °C) für verschiedene TMPs von 13, 113, 213 und 263 mbar ermittelt.

Bei einer Temperatur von 20 °C ist für alle angewandten Transmembrandrücke ein Einfluss der Membranbelüftung auf den gemessenen  $R_M$  ersichtlich. Für die Temperaturen 30 °C und 35 °C sind die Schwankungen von  $R_M$  mit und ohne Belüftung weniger ausgeprägt. Die vergleichsweise hohe Belüftungsrate von 20 vvm erzeugt große Luftblasen, wodurch das umgebende Wasser von einem großen Teil der Membranoberfläche verdrängt wird und dessen Permeation somit erschwert. Eine Erhöhung der Temperatur hat trotz der Verringerung der Viskosität des Wassers einen leichten Anstieg von  $R_M$  für alle getesteten TMPs zur Folge, welcher auf die Reaktion des Membranmaterials auf die Temperaturveränderung zurückzuführen ist. Analog zum Membranmodul am *Harvester* steigt der Membranwiderstand mit zunehmendem TMP aufgrund der Kompressibilität der Membran. Die Geometrie und Einzelanordnung der Fasern (anstatt in Bündeln) bedingt einen wesentlich verringerten  $R_M$  am Faserhalter des *Mini-Harvesters* verglichen mit dem Modul im *Harvester*.

### 3.2.3 Filtration partikelbeladener Suspensionen – kritischer Flux

Die Reinstwasserpermeabilität einer Membran aus dem vorhergehenden Kapitel 3.2.2 gibt den maximalen Permeat-Flux pro  $\text{m}^2$  Membranfläche und angewandtem TMP der eingesetzten Membran an. Dieser Fluss wird bei der Filtration partikelbeladener, realer Suspensionen allerdings nicht oder nur für einen marginal kurzen Zeitraum zu Prozessbeginn erzielt. Durch die

Anhaftung von Partikeln und gelösten Substanzen an der Membranoberfläche sowie in den Poren, dem sogenannten Membran-Fouling, kann über einen längeren Zeitraum nur bei Anwendung geringerer Permeatflüsse stabil filtriert werden. Der Absolutwert dieses Fluxes variiert je nach Betriebsbedingungen der Filtration (Membranbelüftung, Konzentration an Feststoffen und gelösten Substanzen im Ausgangsmaterial, Temperatur, usw.) und eingesetzter Membran (Porengröße, Hydrophilie, Material, usw.). Der sogenannte kritische Flux  $J_c$  hat sich als Schwellenwert zur Angabe eines maximal möglichen Permeat-Fluxes etabliert, welche eine stabile Filtration bei geringer Fouling-Entwicklung erlaubt. In der Praxis wird oftmals ein Permeat-Flux angewandt, welcher 80 % des ermittelten kritischen Flux unter den gegebenen Bedingungen bezüglich Membran, Filtrationsanlage und zu trennender Suspension beträgt. Zur weiteren Charakterisierung der in den Filtrationsanlagen *Harvester* und *Mini-Harvester* eingesetzten Membran wurde daher der kritische Flux bestimmt.  $J_c$  wurde für verschiedene Betriebsbedingungen (Membranbelüftung) und Biomassekonzentrationen einer Modellkultur (*Saccharomyces cerevisiae*), als auch realen Algenkulturen (*Chlorella vulgaris*) ermittelt. Einsatz für die Bestimmung des kritischen Flux fand die Anlage *Harvester*, die Ergebnisse sind in Form eines wissenschaftlichen Papers (DOI: <https://doi.org/10.1002/elsc.202100052>) veröffentlicht (siehe Literatur Anhang 7.3). Im Folgenden sind die wichtigsten Ergebnisse zusammengefasst.

Für eine erste Charakterisierung der Filtrationsanlage *Harvester* fand Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) als Modellorganismus Einsatz. Zunächst wurde der kritische Flux  $J_c$  für verschiedene Biotrockenmassekonzentrationen und Belüftungsraten der Membranfasern bestimmt (Tabelle 3-3). Bei einer konstanten Membranbelüftung von 1,25 vvm war eine Abnahme von  $J_c$  mit steigender Biomassekonzentration messbar. Eine Erhöhung der Membranbelüftung von 1,25 auf 2,50 vvm führte aufgrund der verstärkten Durchmischung und Scherkräfte bei geringen Biomassekonzentrationen ( $3,0 \text{ g}_{\text{BTM}} \cdot \text{L}^{-1}$ ) zu einem Anstieg von  $J_c$ . Ohne Membranbelüftung kann aufgrund der durch die fehlende Durchmischung auftretende Sedimentation der Hefezellen am Boden der Filtrationskammer keine Bewertung des kritischen Flux erfolgen. Für hohe Biomassekonzentrationen ( $15,0 \text{ g}_{\text{BTM}} \cdot \text{L}^{-1}$ ) führt die Erhöhung der Belüftung zu einer Reduktion von  $J_c$  aufgrund der erhöhten Scherbelastung und daraus resultierenden Zelllyse.

Tabelle 3-3: Kritischer Flux  $J_c$  von Bäckerhefesuspensionen (*S. cerevisiae*) und Mikroalgenkulturen (axenische *C. vulgaris* H14, nicht-axenische *C. vulgaris* R-117) am *Harvester*.  $J_c$  wurde für verschiedene Biomassekonzentrationen und Belüftungsraten der Membranfasern bestimmt.

Spezies	BTM-Konzentration ( $\text{g}_{\text{BTM}} \cdot \text{L}^{-1}$ )	Belüftung (vvm)	$J_c$ ( $\text{L} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ )	dTMP/dt bei $J_c$ ( $\text{Pa} \cdot \text{min}^{-1}$ )
<i>S. cerevisiae</i>	3,0	0,00	$J_c > 27,48$	4,32
<i>S. cerevisiae</i>	3,0	1,25	25,18	11,01
<i>S. cerevisiae</i>	15,0	1,25	20,60	20,61
<i>S. cerevisiae</i>	3,0	2,50	$J_c > 27,48$	4,04
<i>S. cerevisiae</i>	15,0	2,50	18,32	22,77
<i>C. vulgaris</i> H14	0,8	1,25	$J_c > 32,06$	6,95
<i>C. vulgaris</i> H14	1,0	1,25	$J_c > 22,93$	12,11
<i>C. vulgaris</i> R-117	4,8	1,25	15,57	14,45
<i>C. vulgaris</i> R-117	10,0	1,25	10,08	18,04
<i>C. vulgaris</i> R-117	17,5	1,25	10,08	15,27

Für die Filtrationsanlage *Harvester* wurde eine Belüftungsrate der Membranfasern von 1,25 vvm als Optimum zwischen Fouling-Reduktion und Minimierung der Scherbelastung der Zellen identifiziert. Ein Wert in dieser Größenordnung wurde auch für andere Filtrationsanlagen ermittelt (Alipourzadeh et al. 2016; Wu et al. 2008b).

Tabelle 3-3 zeigt weiterhin Filtrationsdaten, welche mit Mikroalgenbiomasse der Spezies *Chlorella vulgaris* aus verschiedenen Kultivierungsbedingungen (Labor und Außenbetrieb) im großen Maßstab erzeugt wurden. Die Daten erlauben eine Evaluierung des Fouling-Verhaltens der eingesetzten Membran nahe am realen Anwendungsfall. Die getesteten Algensuspensionen enthielten neben Algenzellen auch Zelltrümmer und extrazelluläre Organik (EOM), aufgrund der nicht-axenischen Kultivierung im Außenbereich waren auch Bakterienzellen vorhanden. Im Vergleich zur Modellsuspension (Hefe) waren während der Filtration der Mikroalgenkulturen höhere Druckanstiegsraten ( $dTMP/dt$ ) und niedrigere kritische Flüsse aufgrund der Anwesenheit von EOM und Zelltrümmern (vgl. Tabelle 3-3) messbar. Zudem wurde eine mit verschiedenen Literaturstellen (Castaing et al. 2011; Cheng et al. 2017) vergleichbare, negative lineare Korrelation von BTM und  $J_c$  (Bereich: 1,0-10,0  $g_{BTM} \cdot L^{-1}$ ,  $R^2 = 0,97$ ) ermittelt. Während der Filtration der Kultur mit einer Biomassekonzentrationen von 17,5  $g_{BTM} \cdot L^{-1}$  konnte kein stabiler Filtrat-Flux erreicht werden, weshalb dieses Ergebnis als nicht aussagekräftig eingestuft wird.

Neben der Biomassekonzentration konnten weitere Faktoren als relevant für die Lage des kritischen Flux bei der Filtration von Mikroalgenkulturen identifiziert werden: Unterschiede im Filtrationsverhalten verschiedener Spezies können auf die Eigenschaften der Zelloberfläche zurückgeführt werden, welche die Wechselwirkungen zwischen Zelle und Membranoberfläche definiert. In Konsortien mit großen Partikelgrößenverteilungen (*Chlorella*-R-117-Kultur) ist die Packungsdichte der sich aufbauenden Filterkuchenstruktur und damit deren zusätzlichen Filtrationswiderstand erhöht. Ungünstige Umweltbedingungen wie niedrige Temperaturen oder hohe Lichtintensitäten während der *Chlorella*-R-117-Kultivierung steigern den Gehalt an Zelltrümmern und/oder die EOM-Produktion, wodurch Membran-Fouling verstärkt wird.

### 3.3 Reduktion von Membran Fouling – Rückspülen und Pausieren

Folgend sind die Ergebnisse einer Untersuchung der Effektivität von Dauer und Frequenz des Rückspülens (*Mini-Harvester*, Kapitel 3.3.1) sowie des Pausierens (*Harvester*, Kapitel 3.3.2) auf die Filtration einer Modellsuspension (Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*) diskutiert.

#### 3.3.1 Rückspülen

Die Filtrationsanlage *Mini-Harvester* fand Einsatz für eine Untersuchung des Einflusses von Dauer und Frequenz auf die Effektivität periodischen Rückspülens mittels der Modellsuspension Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*, Soll-Biomassekonzentration von 3  $g_{BTM} \cdot L^{-1}$ ). Der einfache Aufbau des *Mini-Harvesters* erlaubte die Filtration mit konstantem TMP von 213 mbar für einen Zeitraum von 120 min. Das Fouling-Verhalten wurde anhand des Abfalls des Filtrat-Fluxes evaluiert und im Anschluss aus dem daraus berechneten Fouling-Widerstand die Rück-

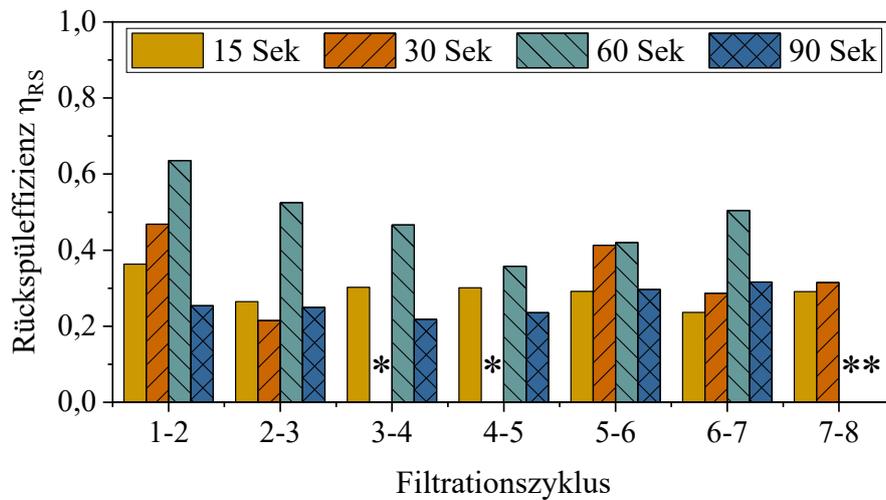
spüleffizienz  $\eta_{RS}$  bestimmt. Um die Effektivität des Rückspülens bei zunehmenden Filtrationszyklen zu ermitteln, wurde die Hefesuspension in einem Kreislauf filtriert. Hierfür wurden die aufkonzentrierte Fraktion (Retentat) sowie das Filtrat zurück in das Vorlagegefäß geführt. Damit konnte ein Einfluss der Zellkonzentration auf das Rückspülen ausgeschlossen werden. Zusätzlich wurden die Ansätze anhand einer realen Filtration überprüft, bei der Filtrat und Retentat in getrennten Behältern gesammelt wurden („Konzentrierung“). Vor jedem Ansatz wurde der Widerstand der sauberen Membran  $R_M$  mit VE-Wasser ermittelt (Abbildung 8-7 im Anhang). Die normierten Filtrat-Flux–Zeit Profile ( $J/J_0$ -t Diagramm) der im folgenden vorgestellten Filtrationsdaten zeigt Abbildung 8-11 im Anhang.

Tabelle 3-4 fasst die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Rückspüldauern (15, 30, 60 und 90 s) zusammen, welche in Anlehnung an Werte aus der Literatur ausgewählt wurden (Vera et al. 2015; Villarroel et al. 2013; Le-Clech et al. 2006). Zwischen dem Rückspülen wurde jeweils für 15 min filtriert. Ein Filtrationszyklus besteht damit aus der Filtrationszeit (15 min) plus der Dauer des Rückspülvorganges.

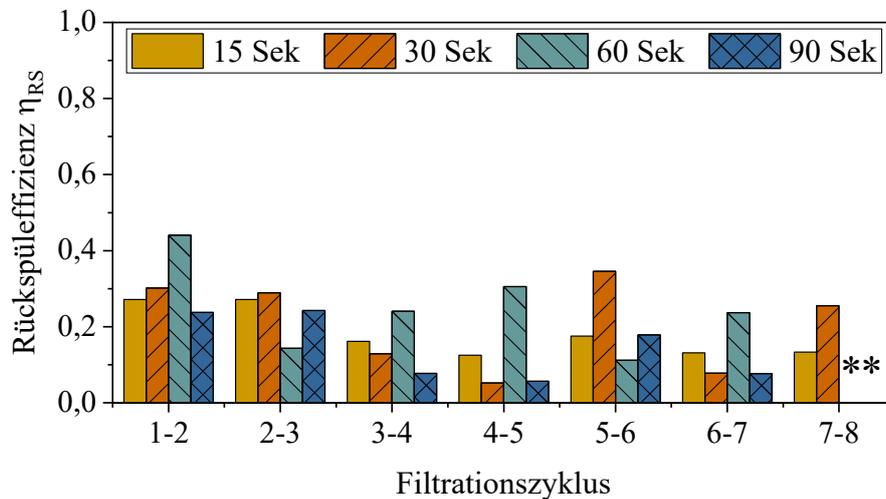
Tabelle 3-4: Getestete Rückspüldauer bei einer Filtration von *S. cerevisiae* im *Mini-Harvester* zur Untersuchung der Effektivität des Rückspülens.

	Dauer Filtrationszyklus			Anteil Rückspülen am Zyklus
	<i>Filtration</i> (min)	<i>Rückspülen</i> (s)	<i>Gesamt</i> (min)	
1	15	15	15,25	1,64 %
2	15	30	15,50	3,23 %
3	15	60	16,00	6,25 %
4	15	90	16,50	9,09 %

Wird Hefe bei konstantem TMP filtriert und alle 15 min für 15, 30, 60 beziehungsweise 90 s rückgespült, kann die in Abbildung 3-14 A (Kreislauf) und B (Konzentrierung) gezeigte Rückspüleffizienz jeweils zwischen zwei Filtrationszyklen bestimmt werden. Werden die Hefezellen im *Mini-Harvester* aufkonzentriert, erzeugen die höheren Biomassekonzentrationen eine deutlich reduzierte Effizienz (5-45 %) des Rückspülvorganges. Die geringere Biomassekonzentration während der Filtration im Kreislauf reduziert Fouling-Effekte, wodurch das Rückspülen wirksamer ist (20-60 %). Mit zunehmender Rückspüldauer (bis 60 s) ist ein verbessertes Ablösen des Filterkuchens, einhergehend mit einer höheren Rückspüleffizienz im Kreislaufbetrieb zu beobachten. Ein längeres Rückspülen von 90 s kann  $\eta_{RS}$  hingegen nicht steigern. Werden die Hefezellen aufkonzentriert, geht für die meisten Zyklen eine Rückspüldauer von 60 s mit der höchsten Rückspüleffizienz (45-30 %) einher. Aus dem zeitlichen Verlauf von  $\eta_{RS}$  beider Betriebsweisen (Kreislauf und Konzentrierung) kann in Übereinstimmung mit der Literatur eine Rückspüldauer von 60 s als Optimum angegeben werden (Vera et al. 2015). Eine Verbesserung der geringen Effektivität des Rückspülens auch bei längerer Dauer kann durch eine gleichzeitige Belüftung der Membranfasern erzielt werden (Vera et al. 2015).



A



B

Abbildung 3-14: Rückspüleffizienz  $\eta_{RS}$  zwischen den Filtrationszyklen (A&B) einer Hefesuspension. Retentat und Filtrat wurden in das Vorlagegefäß zurückgeführt (A: Kreislauf), oder getrennt in Gefäßen gesammelt (B: Konzentrierung), wodurch die Biomassekonzentration im *Mini-Harvester* gleichblieb (A) beziehungsweise anstieg (B). Alle 15 Minuten wurden die Membranfasern für 15, 30, 60 oder 90 Sekunden bei konstantem Druck (100 mbar) rückgespült.

\*: keine Bestimmung des Wertes aufgrund fehlender Filtrationsdaten möglich.

In der Literatur wird die Frequenz des Rückspülens als Hauptfaktor für dessen Effizienz genannt (Robles et al. 2013; Lew et al. 2009). Häufiges Rückspülen kann zum Eintritt von Makromolekülen in die Membranporen führen und damit den Anteil an irreversiblen Fouling in den ersten Filtrationszyklen erhöhen (Wu et al. 2008a). Hefe wurde daher im Kreislauf filtriert und die Membranfasern im Abstand von 5, 15 beziehungsweise 30 Minuten für 30 s rückgespült. Für die Einstellungen 15 min/30 s und 30 min/30 s wurde zusätzlich auch mit der Prozessführung „Aufkonzentrieren“ filtriert.

Für die Bewertung der Rückspülfrequenzen wurde die Rückspüleffizienz  $\eta_{RS,ges}$  zwischen Anfang und Ende des Filtrationsprozesses im *Mini-Harvester* bestimmt, zudem wurde der während der Filtration entstandene Fouling-Widerstand  $R_{Fouling,ges}$  quantifiziert (siehe Abbildung 3-15).

Bei ähnlich hohen Filtrationswiderständen  $R_{\text{Fouling,ges}}$  ist die Rückspüleffizienz bei einer Rückspülfrequenz von 30 min wesentlich höher ( $\sim 37\%$ ), im Vergleich zu 5 min ( $\sim 10\%$ ). Durch das häufige Rückspülen ist die Ausbildung einer reversiblen Deckschicht auf der Membranoberfläche gestört, welche irreversible Fouling-Effekte reduziert. Zudem führt die erleichterte Penetration von Makromolekülen in die Membranporen durch das Rückspülen zu einer vermehrten Ausbildung irreversibler Fouling-Effekte, welche im nächsten Zyklus durch die Anti-Fouling-Maßnahme nicht entfernt werden können und damit die Effektivität des Rückspülens reduzieren. Die RS-Frequenz von 15 min kann die Effektivität des Rückspülens im Kreislauf Betrieb nicht steigern im Vergleich zu 30 min. Bei einer Aufkonzentrierung der Hefezellen ist zwar der Fouling-Widerstand bei einer RS-Frequenz von 30 min gegenüber 15 min erhöht,  $\eta_{\text{RS,ges}}$  liegt aber sogar etwas oberhalb. Für eine Langzeitanwendung des *Mini-Harvesters* zur Mikroalgenabtrennung wird eine Rückspülfrequenz von 30 min festgelegt, um eine effektive Fouling-Kontrolle bei möglichst geringer Verdünnung des Retentats zu erreichen.

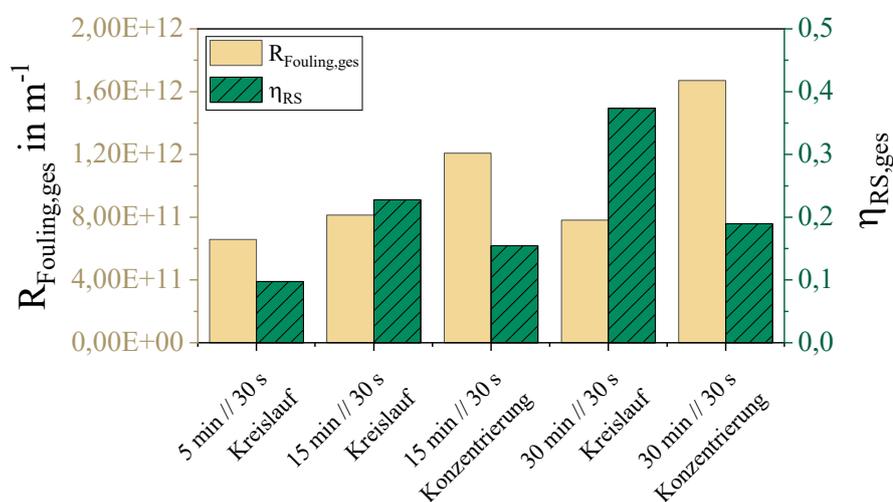


Abbildung 3-15: Rückspüleffizienz  $\eta_{\text{RS,ges}}$  zwischen Anfang und Ende der Filtration einer Hefesuspension im *Mini-Harvester* sowie der währenddessen entstandene gesamte Fouling-Widerstand  $R_{\text{Fouling,ges}}$ . Alle 5, 15 beziehungsweise 30 Minuten wurden die Membranfasern für 30 Sekunden bei konstantem Druck (100 mbar) rückgespült.

### 3.3.2 Pausieren

Das Pausieren (PA) ist eine Maßnahme zur Reduktion von reversiblen Fouling-Phänomenen an Filtrationsmembranen. Dabei wird der Permeat-Flux in regelmäßigen, sich wiederholenden Abständen (nach Ablauf des Filtrationsintervalls) für eine bestimmte Zeit (Pausierintervall) ausgesetzt. Die Parameter Dauer und Frequenz der Anti-Fouling-Maßnahme Pausieren wurden an der Filtrationsanlage *Harvester* mittels der Modellsuspension Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) untersucht. Verschiedene Kombinationen bezüglich der Dauer der Filtration sowie des Pausierens wurden angewandt und hinsichtlich ihrer Effektivität zur Reduktion von Fouling verglichen. Hierfür wurde eine Hefesuspension mit einer Soll-Biomassekonzentration von  $3 \text{ g}_{\text{BTM}} \cdot \text{L}^{-1}$  für die Dauer von 240 min bei einem überkritischen Permeat-Flux ( $24,74 \text{ L} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ) filtriert. Tabelle 3-5 fasst die Parameter der vier Ansätze zusammen, ein Filtrationsintervall

besteht aus der Zeit der Filtration plus der Pause. Die Biomassekonzentration in der Trennkammer des *Harvesters* wurde während der gesamten Filtrationsdauer konstant gehalten (Abbildung 8-12 im Anhang).

Tabelle 3-5: Zusammenfassung der verschiedenen Ansätze der Untersuchung von Dauer und Frequenz des Pausierens auf die Wirksamkeit der Fouling-Reduktion an der Filtrationsanlage *Harvester*. Die Experimente wurden mit einer Hefesuspension ( $3 \text{ g}_{\text{BTM}} \cdot \text{L}^{-1}$ ) für eine Gesamt-Filtrationsdauer von 240 min durchgeführt.

Kürzel	Permeat- Flux ( $\text{L} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ )	BTM ( $\text{g}_{\text{BTM}} \cdot \text{L}^{-1}$ )	Belüftungsrate (vvm)	Intervalldauer		Gesamt (min)
				Filtration (min)	Pausieren (s)	
P5/60	24,75	2,97	1,25	5	60	6,0
P15/60	24,75	2,80	1,25	15	60	16,0
P15/30	24,75	2,93	1,25	15	30	15,5
P30/60	24,75	2,33	1,25	30	60	31,0

Zur Bewertung der Effektivität des Pausierens wurden zwei Parameter herangezogen: Neben der Pausiereffizienz ( $\eta_{\text{PA}}$ , Reduktion des TMP nach der Pause) zwischen zwei Filtrationsintervallen  $i$  und  $i+1$ , spielt die Druckerhöhung innerhalb eines Intervalls  $i$  ( $d\text{TMP}/dt$ ) beziehungsweise über die gesamte Versuchsdauer (240 min) eine Rolle. Aufgrund der unterschiedlichen Frequenzen der Pausen von 5, 15 oder 30 min wurden für die jeweiligen Ansätze verschiedene Zyklenzahlen erreicht. An dieser Stelle sind der Übersichtlichkeit halber für beide Bewertungskriterien lediglich für die ersten beziehungsweise zwischen den ersten acht Filtrationszyklen dargestellt, eine Abbildung aller aufgenommenen Werte ist im Anhang zu finden (Abbildung 8-13).

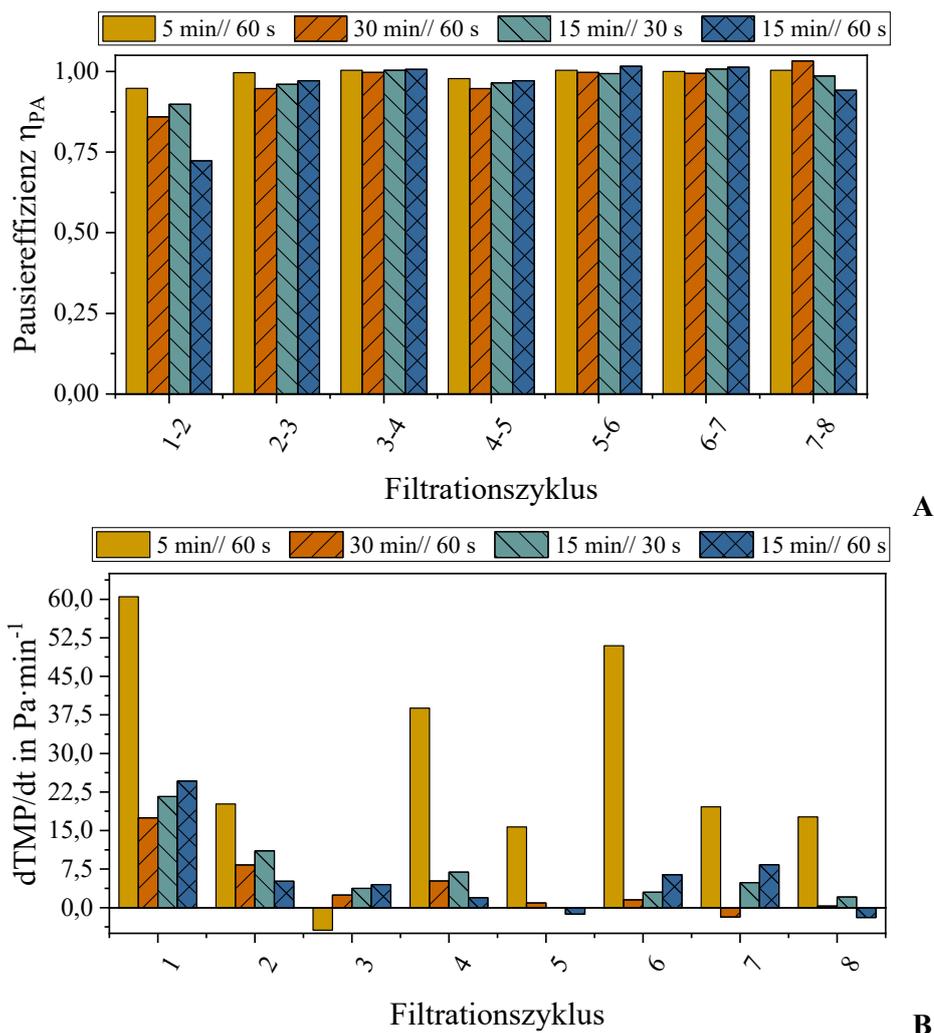


Abbildung 3-16: Evaluation von Dauer und Frequenz des Pausierens als Anti-Fouling Maßnahme mittels einer Hefesuspension ( $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) an der Filtrationsanlage *Harvester*. Die Pausiereffizienz ( $\eta_{PA}$ ) zwischen den Filtrationszyklen (A) sowie TMP-Anstieg innerhalb eines Filtrationszyklus (B) wurden im zeitlichen Verlauf (Filtrationszyklen) aufgetragen und evaluiert.

Für alle getesteten Ansätze (5 min/60 s, 15 min/60 s, 15 min/30 s, 30 min/60 s) hat das Pausieren zwischen den ersten beiden Filtrationsintervallen (1-2) die geringste Effizienz (Abbildung 3-16 A). Mit zunehmender Intervallzahl (ab Zyklus 2-3), konnten hohe Werte für  $\eta_P$  zwischen 94,16 und 104,38 % bestimmt werden (Abbildung 3-16 A), welche eine effektive Fouling-Kontrolle andeuten. Analog dazu war der Anstieg des TMP (dTMP/dt) innerhalb des ersten Filtrationsintervalls für alle getesteten Ansätze am höchsten (Abbildung 3-16 B). Nach der Ausbildung einer Deckschicht zu Beginn der Filtration können auch für diesen Parameter eine gute Fouling-Reduktion angegeben werden. Die hohen Werte für dTMP/dt des Ansatzes 5 min/60 s sind auf das kurze Filtrationsintervall zurückzuführen, bei welchem die für die Regelung benötigte Zeit (1-3 min) stark ins Gewicht fällt.

Für die Gesamtdauer der Filtration von 240 min wurde der geringste Druckanstieg (gleichbedeutend mit der besten Fouling-Reduktion) für den Ansatz 5 min/60 s gemessen (siehe Tabelle

3-6). Die Ansätze 15 min/30 s und 30 min/60 s konnten ähnlich gute Ergebnisse erzielt werden. Mit einem vergleichsweise sehr hohen Anteil der Pause an der Filtrationszeit (> 16 %) ist der Ansatz 5 min/60 s für die Anwendung einer Filtration nicht zu empfehlen. Zudem kann das häufige An- und Abfahren der Pumpen und Anlage problematisch für Zellen (Stress) und Peripherie (Abnutzung) sein. Für die Anwendung des Pausierens zur Fouling-Kontrolle werden daher die Kombinationen 15 min/30 s und 30 min/60 s empfohlen.

Tabelle 3-6: Evaluation des zeitlichen Aufwands verschiedener Kombinationen aus Dauer und Frequenz des Pausierens auf die Wirksamkeit der Fouling-Reduktion. Die verschiedenen Ansätze wurden bezüglich des Anteils der Pausenzeit am Filtrationszyklus sowie der TMP-Erhöhung im angewandten Versuchszeitraum von 240 min miteinander verglichen.

<b>Kürzel</b>	<b>Anteil Pause-Zeit an Filtrationszyklus</b> (Dauer Filtration + Dauer Pausieren)	<b>dTPM/dt (Pa·min)</b> (innerhalb von 240 min)
P5/60	16,67 %	2,05
P15/60	6,25 %	3,73
P15/30	3,23 %	2,68
P30/60	3,23 %	2,46

### 3.4 Fouling-Verhalten von Mikroalgensuspensionen

Durch die reversible und irreversible Anhaftung von Partikeln in den Membranporen sowie an der Membranoberfläche (Fouling) kommt es zu einer Erhöhung des für das Filtrat zu überwindenden Widerstandes während einer Filtration. Fouling-Effekte erhöhen somit den Energiebedarf von Filtrationsanlagen und haben somit einen negativen Einfluss auf den ökonomischen und ökologischen Fußabdruck des Prozesses. Neben der Optimierung von Fouling reduzierenden Maßnahmen (siehe Kapitel 3.3), kann auch eine Anpassung der zu trennenden Suspension Membranverblockung reduzieren. Selbstverständlich ist dies nur innerhalb gewisser Grenzen möglich, nichtsdestotrotz ist die Kenntnis der Fouling-Neigung der einzelnen Komponenten einer Suspension wichtig für die Prozessoptimierung. Werden Komponenten in einer Kulturbühe identifiziert, welche maßgeblich irreversibles Fouling verursachen, kann beispielsweise die Prozessführung der vorangegangenen Kultivierung angepasst werden, um die Bildung dieser Komponente zu minimieren. Zudem kann eine Anpassung des Reinigungsprotokolls erfolgen und der Anlagenbetrieb ist besser planbar, da Reinigungsintervalle abgeschätzt werden können. Gerade in der Abwasseraufbereitung ist eine Prozessoptimierung zur Kostenreduktion essenziell, da keine hohen Gewinne erzielt werden können. Im Folgenden sind die Ergebnisse einer Untersuchung des Einflusses verschiedener Komponenten einer Mikroalgensuspension auf das Membran-Fouling diskutiert. Hierfür wurden die verschiedenen Fraktionen einzeln im *Mini-Harvester* filtriert und das Filtrat-Flux – Zeit – Profil aufgenommen. Dieses wiederum erlaubte die Ermittlung und Evaluierung der dabei entstandenen Fouling-Widerstände.

### 3.4.1 Einfluss von Wachstumsphase und Biomassekonzentration einer Algenkultur

Während der Kultivierung von Mikroalgen im Satzbetrieb werden die Eigenschaften des Kulturmediums sowie der Algenzellen (Zelloberfläche sowie makromolekulare Zusammensetzung) durch den Konsum von Nährstoffen, der Sekretion von organischem Material (EOM) sowie der Zunahme der Zell-Konzentration (einhergehend mit der Verringerung der Lichtverfügbarkeit pro Zelle) verändert. Beispielsweise werden Menge und Art des EOM von der Dauer der Kultivierung – sprich dem Alter sowie der Wachstumsphase der Kultur – bestimmt (Zhang et al. 2012; Ye et al. 2019). Zudem bedingen höhere Biomassekonzentrationen die Ausbildung von Filterkuchen, deren Struktur durch die Interaktion mit EOM verdichtet werden kann (Bourcier et al. 2016). Für den Einsatz der Membranfiltration im Zuge einer Langzeitanwendung wie bei einem Membran-Photobioreaktor zur Abwasseraufbereitung, ist die Kenntnis des Fouling-Verhaltens der Mikroalgensuspension in den verschiedenen Wachstumsphasen ein wertvolles Werkzeug zur Optimierung der Anti-Fouling Maßnahmen. Im Zuge dessen war die Untersuchung des Einflusses der Wachstumsphase während einer Satz-Kultivierung sowie der Biomassekonzentration Gegenstand der Experimente der vorliegenden Arbeit. Hierfür wurden Algenzellen der Spezies *Chlorella vulgaris* in der exponentiellen, linearen und stationären Wachstumsphase wie in Abschnitt 2.7.5 (Fraktionierte Filtration von Algensuspensionen (*Mini-Harvester*)) fraktioniert und im Anschluss mittels der Filtrations-Anlage *Mini-Harvester* in zwei (Resuspensionen) beziehungsweise drei (native Suspension und Überstand) konsekutiven Filtrationszyklen filtriert. Zwischen den Zyklen wurde mit VE-Wasser rückgespült. Die Kultivierung fand in einem 2 L-Photobioreaktorsystem in BB-Medium bei 25 °C, pH 7,5 und  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  statt. Vor der Filtration jeder Fraktion wurde der Widerstand der sauberen Membran  $R_M$  mit VE-Wasser ermittelt (Abbildung 8-9 im Anhang).

Die Wachstumskurve in Abbildung 3-17 zeigt den typischen zeitlichen Verlauf der Biotrockenmasse sowie der  $OD_{750}$  einer Mikroalgenkultivierung. Die gewählten Abbruchpunkte (Tag 3, Tag 5 und Tag 7) liegen in den Bereichen der exponentiellen (E, rot), linearen (L, grün) und stationären (S, blau) Wachstumsphase. Während der exponentiellen Wachstumsphase wachsen Mikroalgen mit der höchsten Wachstumsrate, da alle für die Teilung benötigten Substrate (Nährstoffe und Licht) vorhanden sind. In der darauffolgenden linearen Phase treten erste Limitierungen auf, wodurch die Wachstumsrate auf einen konstanten Wert reduziert wird. Die Zellteilung in der stationären Phase erliegt nahezu aufgrund des Mangels an Nährstoffen sowie einer geringen Verfügbarkeit von Licht pro Einzelzelle. (Posten 2018)

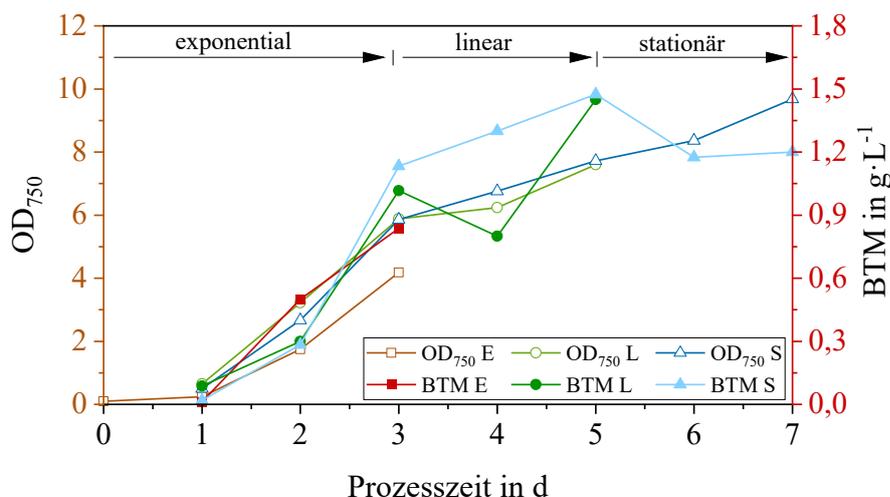


Abbildung 3-17: Wachstumskurve (Biotrockenmasse, OD<sub>750</sub>) der *Chlorella vulgaris* Kulturen nach drei, fünf oder sieben Tagen. Die Kultivierung fand in BB-Medium bei 25 °C, pH 7,5 und 300 µmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> statt. Nach Kulturabbruch (Tag 3, Tag 5, Tag 7) wurden die einzelnen Fraktionen der Mikroalgensuspensionen am *Mini-Harvester* filtriert.

Der Stickstoffgehalt im Medium erlaubt eine theoretische Biomassekonzentration von 0,42 g·L<sup>-1</sup>, unter der Annahme eines Stickstoffgehaltes von 10 %. Die gemessene Biotrockenmasse lag für alle Abbruchpunkte oberhalb dieses Wertes, weshalb eine ansteigende N-Limitierung für die Kultur mit zunehmender Dauer anzunehmen ist. Dieser Mangel induziert die Bildung intrazellulärer Speicherstoffe (hier: Kohlehydrate) in der Grünalge *C. vulgaris* (Safi et al. 2014). Institutsintern wurde ein minimaler Kohlehydratgehalt von ~20 % für die Mikroalge *C. vulgaris* im bezüglich Nährstoffen nicht-limitierten Zustand gemessen, dementsprechend kann der Stickstoffmangel für die Kultur der exponentiellen Wachstumsphase als minimal klassifiziert werden (siehe  $q_{\text{Kohlehydrat}}$  in Tabelle 3-7). Der Anstieg des intrazellulären Kohlehydratgehalts mit zunehmendem Kulturalter (Tabelle 3-7) spiegelt die Zunahme der Stickstofflimitierung wider. Der vergleichsweise geringe Pigmentgehalt von  $q_{\text{Pigmente}} < 1\%$  aller Kulturen (Safi et al. 2014) kann als Folge dieses Mangels sowie einer ausreichenden Lichtversorgung der Zellen interpretiert werden.

Tabelle 3-7: Biomassekonzentration intrazellulärer Kohlehydrat- beziehungsweise Pigmentgehalt einer *C. vulgaris* Kultur. Die Zellen wurden in der exponentiellen (E), linearen (L) und stationären (S) Wachstumsphase einer Kultivierung in BB-Medium bei 25 °C, pH 7,5 und 300 µmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> beprobt.

Kürzel	Kultivierungsdauer	BTM in g·L <sup>-1</sup>	OD <sub>750</sub>	$q_{\text{Kohlehydrat}}$	$q_{\text{Pigmente}}$
E	3 Tage	0,838	4,18	0,19	0,009
L	5 Tage	1,450	7,60	0,25	0,004
S	7 Tage	1,200	9,68	0,38	0,005

Zur besseren Vergleichbarkeit wurde der während der Filtration der einzelnen Fraktionen gemessene Fouling-Widerstand  $R_{\text{Fouling}}$  bezüglich des zu Beginn auftretenden Widerstandes  $R_{\text{Fouling},0}$  normiert und der zeitliche Verlauf aufgetragen (Abbildung 3-18). Für jede Fraktion ist nach

einem steilen Anstieg von  $R_{\text{Fouling}}/R_{\text{Fouling},0}$  gefolgt von einer kurzen Übergangsphase eine langsamere Zunahme des Widerstandes zu beobachten. Die saubere Membran (zum Filtrationsbeginn beziehungsweise nach dem Rückspülen) ist also sehr anfällig für ein schnelles Anhaften von Partikeln. Die Ausbildung eines Filterkuchens bewirkt die verlangsamte Reduktion der Permeabilität. Zur Evaluierung der fraktionierten Filtration wurde außerdem das jeweils während der ersten beiden Filtrationszyklen gebildete Gesamt-Fouling  $R_{\text{Fouling,ges}}$  jeder Fraktion der verschiedenen Wachstumsphasen (Abbildung 3-19) herangezogen. Die Güte des Rückspülens beziehungsweise die Art des entstandenen Foulings (reversibel oder irreversibel) zwischen den Filtrationszyklen kann anhand dieses Verlaufs beurteilt werden. Bei einer vollständigen Entfernung des im vorhergehenden Zyklus gebildeten Foulings liegt der Start-Wert von  $R_{\text{Fouling}}/R_{\text{Fouling},0}$  im folgenden Zyklus bei 1,0. Eine Erhöhung des Start-Wertes impliziert verbliebenes Fouling, welches gemäß der Definition in der vorliegenden Arbeit als irreversibel klassifiziert wird.

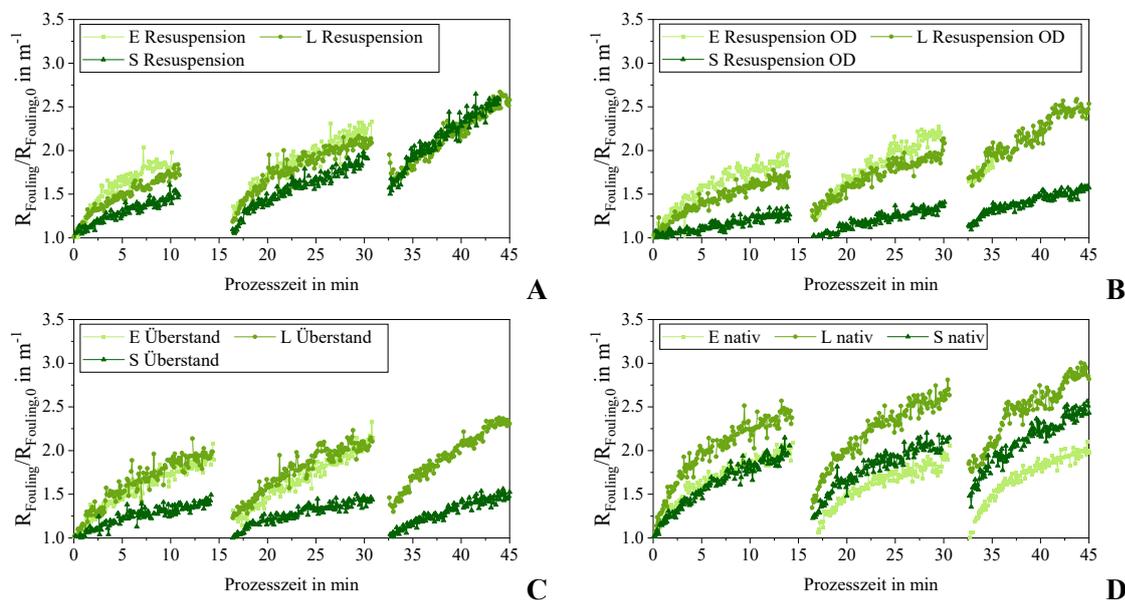


Abbildung 3-18: Zeitlicher Verlauf normierten Fouling-Widerstandes  $R_{\text{Fouling}}/R_{\text{Fouling},0}$  verschiedener Fraktionen einer *C. vulgaris* Suspension unterschiedlichen Kulturalters einer Filtration am *Mini-Harvester*. (A: Algenzellen in VE-Wasser resuspendiert, B: Algenzellen in VE-Wasser resuspendiert mit angepasster  $OD_{750}$ , C: zellfreier Überstand, D: native Suspension) Ein Abbruch der Kultivierung fand in der exponentiellen (E), linearen (L) oder stationären (S) Wachstumsphase statt. Die  $OD_{750}$  der nativen Suspension sowie der Resuspension betrug 4,18 (E), 7,60 (L) sowie 9,68 (S) und wurde für die Resuspension mit angepasster  $OD_{750}$  auf 4,18 eingestellt.

Der Einfluss der Zell-Konzentration auf die Fouling-Bildung kann durch den Vergleich der in VE-Wasser resuspendierten Zellen mit und ohne Anpassung der Konzentration auf eine  $OD_{750}$  von 4,18 evaluiert werden (siehe Abbildung 3-19 und Abbildung 3-18 A & B). Die Resuspension der Zellen der exponentiellen Wachstumsphase (E) weist trotz der wesentlich geringeren Biomassekonzentration eine hohe Fouling-Neigung auf: Zum einen liegen die Werte des Gesamt-Fouling-Widerstandes aller Resuspensionen in einem ähnlichen Bereich (Abbildung 3-19), zudem zeigt der normierte Fouling-Widerstand in Abbildung 3-18 A die stärkste Erhöhung des

Startwertes. Zwischen den Zellen der exponentiellen und linearen Wachstumsphase mit und ohne Anpassung der OD fallen die Unterschiede im Zeitprofil von  $R_{\text{Fouling}}/R_{\text{Fouling},0}$  geringer aus, für beide Ansätze ist irreversibles Fouling bereits zwischen dem ersten und zweiten Filtrationszyklus messbar (Abbildung 3-18 A & B). Die Reversibilität des Foulings wird für Zellen der linearen Wachstumsphase also maßgeblich von der Oberflächenstruktur der Zellen und weniger von deren Konzentration beeinflusst. Für die Zellen der linearen und stationären Wachstumsphase sinken die Werte für  $R_{\text{Fouling,ges}}$  bei einer Reduktion der Zellzahl (Abbildung 3-19), wobei die Zellen der stationären Phase den geringsten Fouling-Widerstand erzeugen. Aus der Literatur ist eine Zunahme des Zeta-Potentials der Zelloberfläche von *Chlorella vulgaris* mit zunehmendem Kulturalter während einer Satz-Kultivierung bekannt (Chang und Lee 2012). Das veränderte Zeta-Potential wird mit einer Stickstofflimitierung assoziiert, welche eine Reduktion der funktionellen Gruppen (hauptsächlich Polysaccharide und Proteine) auf der Zelloberfläche bewirkt (Zhang et al. 2012). Dies wiederum führt zur Reduktion der elektrostatischen Abstoßung zwischen den Zellen und einer daraufhin verstärkten Flokkulation der Mikroalgen (Salim et al. 2013), sowie zu einer veränderten Neigung der Zellen zur Anhaftung an beispielsweise der Membranoberfläche (Zhang et al. 2012). Aufgrund des ansteigenden intrazellulären Kohlehydratgehaltes mit zunehmendem Kulturalter kann – wie bereits diskutiert – eine zunehmende Stickstofflimitierung der Zellen der linearen und stationären Wachstumsphase angenommen werden. Entsprechend kann die erhöhte Fouling-Neigung der Zellen der exponentiellen Wachstumsphase auf die veränderten Charakteristika der Zelloberfläche von *C. vulgaris* aufgrund der Nährstoffversorgung zurückgeführt werden.

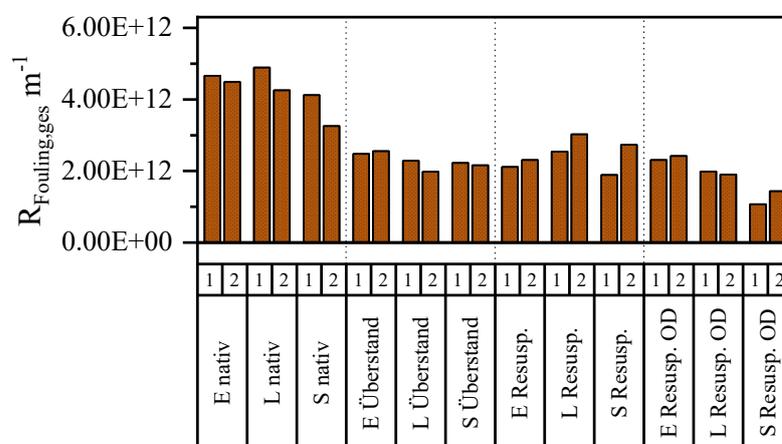


Abbildung 3-19: Gesamt-Fouling-Widerstand  $R_{\text{Fouling,ges}}$  während der ersten beiden Filtrationszyklen der verschiedenen Fraktionen einer *C. vulgaris* Suspension unterschiedlichen Kulturalters am *Mini-Harvester*. Die Kultivierung wurde in der exponentiellen (E), linearen (L) oder stationären (S) Wachstumsphase abgebrochen und die verschiedenen Fraktionen (native Suspension, Überstand, Algenzellen in VE-Wasser resuspendiert und Algenzellen in VE-Wasser resuspendiert mit angepasster  $OD_{750}$ ) aus der so erzeugten Mikroalgenkultur für die darauffolgende Filtration hergestellt. Die  $OD_{750}$  der nativen Suspension sowie der Resuspension betrug 4,18 (E), 7,60 (L) sowie 9,68 (S) und wurde für die Resuspension mit angepasster  $OD_{750}$  auf 4,18 eingestellt.

Eine Zunahme der Menge an EOM mit steigendem Kulturalter ist aus der Literatur bekannt, wobei dessen spezifische Charakteristika (Molekulargewicht, biochemische Zusammensetzung)

maßgeblich das Fouling-Verhalten während der Membranfiltration bestimmen (Ye et al. 2019; Zhang et al. 2012). Zwar wurden die EOM-Konzentrationen der einzelnen Überstände nicht angepasst, dennoch scheint der Gehalt an EOM eine untergeordnete Rolle zu spielen, da der entstehende Gesamt-Fouling-Widerstand beider Zyklen des jeweiligen zellfreien Überstandes aller Ansätze in einem ähnlichen Bereich liegt (Abbildung 3-19). Unterschiede sind in der Reversibilität des Foulings messbar (Abbildung 3-18 C): Während die Organik der Zellen der stationären Wachstumsphase hauptsächlich reversibles Fouling verursacht, können die gelösten Substanzen der Ansätze der exponentiellen und linearen Wachstumsphase die Membran irreversibel verblocken. Die Biochemie des von *Chlorella vulgaris* in verschiedenen Wachstumsphasen sekretierte EOM spielt also im Fouling-Verhalten eine größere Rolle als dessen absolute Konzentration. Dabei scheint eine Nährstofflimitierung (lineare und stationäre Wachstumsphase) die Fouling-Neigung der Organik zu reduzieren.

Das Konvolut an Zellen, EOM und Zelldebris in den nativen Suspensionen verändert das Fouling Verhalten im Vergleich zu den einzelnen Fraktionen. Hier ist jeweils der höchste Fouling-Widerstand messbar, da Partikel unterschiedlicher Größe die Ausbildung dichter Filterkuchen begünstigen (Kinnarinen et al. 2017; Wiącek und Stasiak 2018). Für die native Suspension der Zellen der linearen Wachstumsphase ist der höchste Wert für  $R_{\text{Fouling, ges}}$  messbar, auch das zeitliche Profil des normierten Widerstandes zeigt die stärkste Zunahme (Abbildung 3-19 und Abbildung 3-18 D). Das in den Filtrationszyklen entstandene Fouling der Zellen der linearen und stationären Wachstumsphase konnte durch Rückspülen nicht vollständig entfernt werden (Abbildung 3-18 D). Trotz der geringeren Anhaftung der Einzelkomponenten ist die Interaktion zwischen den Partikeln (Zellen und EOM) aufgrund deren höherer Konzentrationen verstärkt und führt zu einer höheren Fouling Neigung im Vergleich zur Suspension der Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase.

Für eine Langzeitfiltration sowie einen kontinuierlichen Filtrationsbetrieb können Nährstofflimitierungen auch bei höheren Biomassekonzentrationen zu einer Verringerung der Fouling-Neigung führen. Für die Abwasseraufbereitung kann diese Erkenntnis ausgenutzt werden, da eine vollständige Entfernung von Stickstoff und Phosphor obsolet ist. Hinsichtlich der Optimierung der Reduktion des Membran-Foulings sollte die Biomassekonzentration durch die Filtrationseinheit so eingestellt werden, dass eine leichte Nährstofflimitierung erzeugt wird.

### **3.4.2 Fouling-Beitrag der Komponenten einer Algensuspension verschiedener Mikroalgenspezies**

Eine Algensuspension enthält neben Algenzellen ggf. auch Bakterienzellen, Zelltrümmer sowie in der flüssigen Phase gelöste, organische Substanzen (EOM). Jede dieser Komponenten verursacht einzeln ein Verblocken der Membran, der Einfluss kann sich im Konvolut potenzieren. Besonders die Kultivierungsbedingungen beeinflussen die Kulturzusammensetzung, da diese sowohl die Algenzellen selbst als auch die von ihnen produzierte Organik bestimmt. Ein unter Laborbedingungen hergestelltes Kulturmedium kann optimal auf die Bedürfnisse der zu kultivierenden Mikroorganismen abgestimmt werden, zudem ist es möglich, Substanzen zu meiden, welche Fouling verursachen können. Werden Mikroalgen in realen Abwässern kultiviert, so spielt dessen Beschaffenheit ebenso eine wichtige Rolle bei der Analyse des Membran-

Fouling. Daher muss bei der Untersuchung des Filtrationsprozesses von Mikroalgen, welche zur Abwasseraufbereitung eingesetzt werden, auch das entsprechende Abwasser berücksichtigt werden. Die Ergebnisse einer solchen Untersuchung wurden in Form eines wissenschaftlichen Papers (DOI: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2022.120744>) veröffentlicht (siehe Literatur Anhang 7.2). Dabei wurden die Mikroalgen-Spezies *Desmodesmus* sp. und *Coelastrella* sp. in einem realen, sekundären Abwasser (vorangegangene Entfernung der C-Quellen durch einen anaeroben Membranreaktor als erster Schritt der Abwasseraufbereitung) kultiviert und die Kulturbrühe im Anschluss fraktioniert filtriert. Für die Bestimmung fand die Anlage Mini-Harvester Einsatz, im Folgenden sind die wichtigsten Erkenntnisse der Veröffentlichung zusammengefasst.

Der Filtration der einzelnen Komponenten der Algensuspensionen ging deren Kultivierung im semi-kontinuierlichen Betrieb im Labormaßstab zur Untersuchung der Nährstoffaufnahme voran, deren zentrale Resultate in Kapitel 4.2.2 zusammengefasst sind. Insgesamt wurden fünf Fraktionen der jeweiligen Kulturbrühe filtriert: die native Algensuspension als Fraktion 1, der zellfreie Überstand als Fraktion 2, Algen- und Bakterienzellen vereint gelöst in VE-Wasser (Fraktion 3) beziehungsweise gelöst in frischem sekundärem Abwasser (Fraktion 4) sowie frisches sekundäres Abwasser als Fraktion 5.

Die Filtration aller Fraktionen lieferte das typische Filtrat-Flux – Zeit – Profil, mit einem anfänglichen, schnellen Abfall des Filtrat-Flusses ( $J$ ), gefolgt von einer graduellen Reduktion, welche in einem pseudostationären Gleichgewichts-Flux resultiert (Song 1998). Für beide Algenspezies tritt das Membran-Fouling am stärksten während der Filtration der nativen Kultur auf (Reduktion des Filtrat-Flux auf 15-18 % des Start-Fluxes  $J_0$ ). Die Algen- und Bakterienzellen in Fraktion 3 senken den Flux aufgrund der Abwesenheit von EOM lediglich auf ~ 27-33 % von  $J_0$ . Die Filtration von Fraktion 2 zeigte eine stärkere Reduktion des Filtrat-Flux als bei Fraktion 3, weshalb die im Überstand vorhandene Organik als maßgebliche Ursache des Membran-Fouling identifiziert wurde. Frisches sekundäres Abwasser (Fraktion 5) wurde zur Kontrolle filtriert, eine deutliche Abnahme des Flux auf ~ 25-30 % von  $J_0$  war messbar. Das für die Algenkultivierung verwendete Abwasser trägt also wesentlich zum Fouling-Effekt bei.

Für jede Fraktion wurde der während der Filtration erzeugte Fouling- Widerstand  $R_{\text{Fouling}}$  bestimmt.  $R_{\text{Fouling}}$  ist die Summe des reversiblen ( $R_{\text{reversibel}}$ ) und irreversiblen ( $R_{\text{irreversibel}}$ ) Fouling-Widerstandes. Das Konvolut an Fouling verursachenden Komponenten in Fraktion 1 erzeugt den höchsten Fouling-Widerstand. Das frische sekundäre Abwasser erhöht den Membranwiderstand durch Fouling aufgrund der enthaltenen Organik in einer ähnlichen Größenordnung wie die Fraktionen 2 und 3. Die durch die Mikroalgen gebildeten extrazellulären Polysaccharide in Fraktion 2 haben somit einen untergeordneten Einfluss auf das Membran-Fouling.

Jede Fraktion wurde zudem hinsichtlich der Reversibilität des Fouling anhand des Anteils von  $R_{\text{irreversibel}}$  an  $R_{\text{Fouling}}$  untersucht. Im ersten Filtrationszyklus jeder Fraktion wurde die saubere Membran am stärksten von irreversiblen Fouling befallen. Das sekundäre Abwasser selbst hatte einen starken Anteil am irreversiblen Fouling, erkennbar an den Fraktionen 2 und 5. Die Anwesenheit von Zellen (Fraktion 1) schützt die Membran vor irreversiblen Fouling Effekten durch EOM, vermutlich aufgrund der Ausbildung eines dichten Filterkuchens durch die Algenzellen sowie Interaktionen zwischen Zellen und EOM (Le-Clech et al. 2006). Wurden die Mikroalgen-

und Bakterienzellen in VE-Wasser (Fraktion 3) gelöst, so lagen die Fouling-Widerstände ( $R_{\text{Fouling}}$  und  $R_{\text{reversibel}}$ ) etwa 37-52 % unterhalb derer aus Fraktion 4 (Algen- und Bakterienzellen gelöst in frischem sekundärem Abwasser). Die hohe Fouling-Neigung des sekundären Abwassers kann auf dessen hohe organische Belastung von  $32,3 \text{ mg}_{\text{TOC}} \cdot \text{L}^{-1}$  zurückgeführt werden (Grossman et al. 2021).

Zwischen den beiden getesteten Algenspezies konnten nur geringfügige Unterschiede im Fouling-Verhalten festgestellt werden. Der Vergleich der Fraktionen ergab einen erhöhten Fouling-Widerstand für *Desmodesmus* sp. in Fraktion 1 und 2, dementsprechend werden Menge und Art der gebildeten EOM als die wahrscheinlichste Ursache angenommen. Morphologische Unterschiede der Algenzellen spielen lediglich eine untergeordnete Rolle.

### 3.5 Einsatz des *Harvester* im großen Maßstab

Auf dem Weltmarkt werden Mikroalgen vor allem zur Erzeugung hochpreisiger Produkte ( $> \$10.000 \text{ t}^{-1}$ ) eingesetzt. Die Aufarbeitung der Algenzellen spielt hierbei eine zentrale Rolle, da diese bis zu 30 % der gesamten Produktionskosten ausmachen kann. Die Filtrationsanlage *Harvester* wurde so konzipiert, dass die Anforderungen an eine effiziente Algenabtrennung erfüllt sind. Neben geringen Investitionskosten und einem energiearmen Betrieb, fallen für den *Harvester* zudem moderate Ausgaben für Instandhaltung und Betrieb an. Weiterhin können große Volumina bewältigt werden, wobei eine hohe Aufkonzentrierung der Biomasse ohne Einschränkung des stabilen und kontinuierlichen Betriebs möglich sind. Die eingesetzte Membran erlaubt eine Prozessierung von Algensuspensionen verschiedenster Spezies bei geringem Stress für die Zellen. Zur Demonstration der Effektivität der Anlage sowie die Ermittlung des Energiebedarfs im Anwendungsfall wurde der *Harvester* am *Centre Algatech* des Instituts für Mikrobiologie der Tschechischen Akademie der Wissenschaften in Třeboň zur Filtration von *Chlorella vulgaris* im Pilotmaßstab eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Tests wurden in Form eines wissenschaftlichen Papers (DOI: 10.1002/elsc.202100052) veröffentlicht (siehe Literatur Anhand 7.3). Die wichtigsten Aspekte sind im Folgenden zusammengefasst.

Periodisches Rückspülen sowie eine kontinuierliche Belüftung der Membranfasern (1.25 vvm) konnten als effektive Maßnahmen zur Reduktion von Membran-Fouling identifiziert werden. Der *Harvester* konnte Algensuspensionen verschiedener Konzentrationen ( $1,53\text{-}14,20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) auf bis zu  $40,00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  aufkonzentrieren und dabei hohe Volumenreduktionen (bis zu 11,5-fach) erzielen. Zudem konnte ein stabiler Betrieb zur kontinuierlichen Produktion eines Retentat-Stromes mit einer Biomassekonzentration von  $40,00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  erzeugt werden, wobei die Ausgangssuspension eine Konzentration von  $14,20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  aufwies. Die Ernteeffizienz  $\eta_{\text{Ernte}}$  lag nach kurzer Zeit jeweils bei  $> 99 \%$ .

Der sehr geringe Energiebedarf macht den *Harvester* zu einem idealen Werkzeug für den ersten Schritt in der Aufarbeitung von Mikroalgen. Darüber hinaus kann er für das externe Zellrecycling in der kontinuierlichen Mikroalgenkultivierung, z.B. bei der Abwasseraufbereitung, eingesetzt werden.

# **4 Wachstum und Stoffwechsel von Mikroalgen in kontinuierlichen Kultivierungen auf (synthetischen) Abwässern**

Eine kontinuierliche Aufbereitung von Abwässern ist unabdingbar, da diese permanent sowohl am Tag als auch in der Nacht anfallen. Ein Einsatz von Membrantechnologien in kontinuierlich betriebenen Reaktorsystemen kann dabei sowohl für die anschließende Abtrennung der Mikroalgen vom gereinigten Wasser als auch die Rückführung von Zellen zur Prozessoptimierung geschehen. Die Zahl der jährlichen Veröffentlichungen zum Thema Mikroalgen in der Abwasseraufbereitung hat sich in den letzten 20 Jahren knapp versiebenfacht (Quelle: Scopus), wobei der Großteil der experimentellen Arbeiten noch immer im Satzbetrieb durchgeführt wird, ohne Fokus auf die Algenabtrennung (vgl. Reviews von Wang et al. 2017 oder Nagarajan et al. 2020). Ein Schwerpunkt der Versuche der vorliegenden Arbeit lag daher auf kontinuierlichen und semi-kontinuierlichen Mikroalgenkultivierungen für einen potentiellen Einsatz in der Abwasseraufbereitung, deren Ergebnisse Gegenstand dieses Kapitels sind. In Kapitel 3 wurde die Membranfiltration bereits als Werkzeug zur Mikroalgenabtrennung vorgestellt, das Potential dieser Technologie zur Optimierung des Abwasseraufbereitungsprozesses durch Zellrückführung ist Gegenstand des nachfolgenden Kapitels 5.

Eine wichtige Prozessgröße kontinuierlicher Prozesse ist die Verdünnungsrate, welche als das pro Zeiteinheit ausgetauschte Medienvolumen pro Reaktorvolumen definiert ist. Für kontinuierliche Kultivierungen sind verschiedene Betriebsweisen denkbar, wobei die Vorgabe einer konstanten Verdünnungsrate (Chemostat) im Bereich der Abwasseraufbereitung etabliert wurde. Abhängig der angewandten Verdünnungsrate ändert sich der Versorgungszustand der Mikroalgenzellen mit Nährstoffen, wodurch eine Anpassung der makromolekularen Zusammensetzung der Zelle an die jeweiligen Umweltbedingungen erfolgt. Auch das von der Verdünnungsrate unabhängige „Substrat“ Licht trägt wesentlich zu diesen Veränderungen bei.

Zunächst werden in diesem Kapitel Daten einer kontinuierlichen Kultivierung in einem synthetischen Abwasser mit Hell/Dunkel-Regime vorgestellt (Kapitel 4.1). Fokus des Experimentes lag auf den Veränderungen des Mikroalgenmetabolismus sowie deren Biochemie in Abhängigkeit der angewandten Verdünnungsrate sowohl während den Licht- als auch den Dunkelperioden. Zur Unterstützung der Dateninterpretation wurde das Konzept der aktiven Biomasse angewandt. Zudem wurden Experimente mit einem realen, sekundären Abwasser (AnMBR Effluent) durchgeführt. Diese erlauben eine bessere Übertragung der Ergebnisse auf einen realen Prozess. Hierbei stand einerseits die Nährstoffaufnahme verschiedener Mikroalgenpezies (Kapitel 4.2.2) im Vordergrund. Zudem wurde die Machbarkeit einer mehrstufigen Abwasseraufbereitung mit einem Mikroalgen-PBR als zweite Stufe der biologischen Reinigung im Verlauf eines Kalenderjahres untersucht (Kapitel 4.2.1).

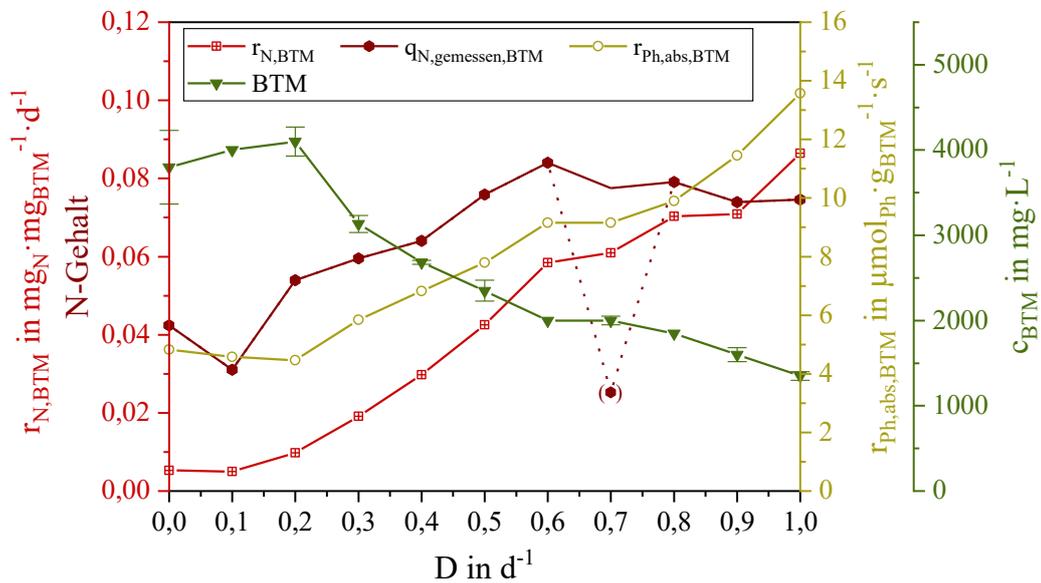
## 4.1 Mikroalgenstoffwechsel bei Variation der Durchflussrate

Als anwendungsnahe Betriebsweise wurde für die im folgenden präsentierten Experimente eine konstante Verdünnungsrate für die kontinuierliche Kultivierung von *Chlorella vulgaris* in einem synthetischen Abwasser und einem Hell/Dunkel-Zyklus von 16 h:8 h gewählt. Mit dem genannten Versuchsaufbau wurde ein relevantes Spektrum an Verdünnungsraten ( $D = 0,0-1,0 \text{ d}^{-1}$  in  $0,1 \text{ d}^{-1}$ -Schritten) abgedeckt, wobei diese jeweils während der 8-stündigen Dunkelphase auf 10 % des Wertes der Hellphase reduziert wurde. Im Fokus der Versuche stand die Nährstoffaufnahme sowie die Veränderungen in der makromolekularen Zusammensetzung der Mikroalgenzellen in Abhängigkeit von der angewandten Verdünnungsrate sowie während der jeweiligen Nachtphase. Zu den metabolischen Aktivitäten von Mikroalgen in Abwesenheit von Licht ist bisher wenig bekannt, weshalb die kontinuierliche Kultur während der Nacht engmaschig beprobt wurde. Die Messdaten wurden zudem unter Anwendung des Konzeptes der aktiven Biomasse ausgewertet, welches im Folgenden in Abschnitt 4.1.2 erläutert wird. Die an dieser Stelle vorgestellten Ergebnisse sind in Form eines wissenschaftlichen Papers veröffentlicht (DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.169082), welches im Literatur-Anhang in Kapitel 7.5 abgedruckt ist.

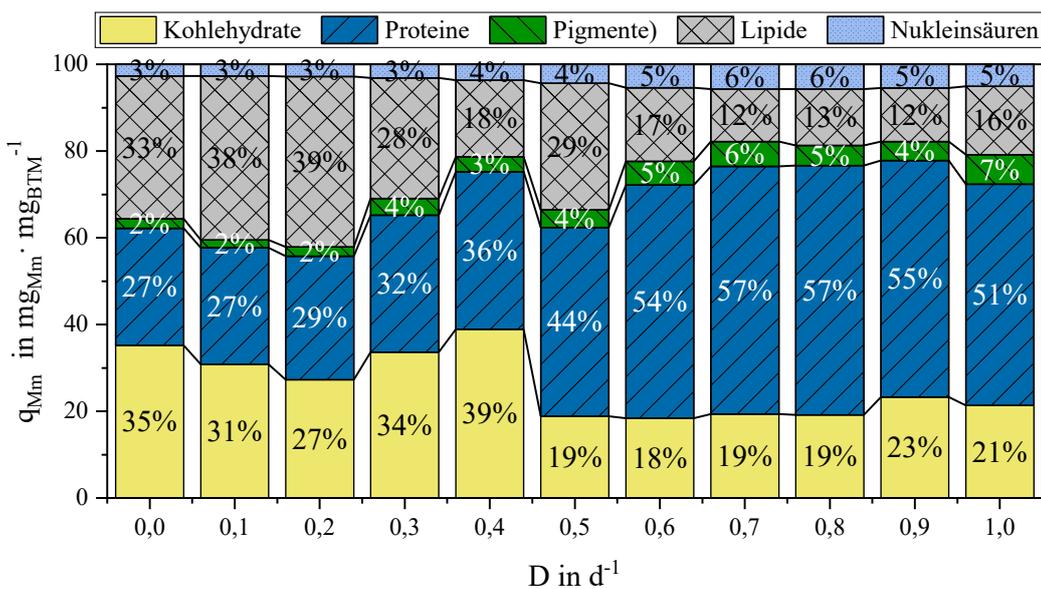
### 4.1.1 Adaption der makromolekularen Zusammensetzung in An- und Abwesenheit von Licht

Bei der kontinuierlichen Kultivierung mit konstanter Verdünnungsrate und Lichtintensität (Chemostat) besteht eine Korrelation zwischen Nährstoffaufnahme sowie der daraus resultierenden makromolekularen Zusammensetzung der Mikroalgenzellen mit der angewandten Verdünnungsrate  $D$  (Dickinson et al. 2013; Samorì et al. 2014). Dies geschieht in einer Rückkopplungsschleife, in der die Nährstoffbereitstellung (Effekt von  $D$ ) sowie die zelluläre Nährstoffaufnahme (beeinflusst durch die umgebende Nährstoffkonzentration) entgegenwirken, bis das Gleichgewicht  $\mu = D$  erreicht ist. Bei geringen Verdünnungsraten führen in der Regel Nährstofflimitierungen zu entsprechend niedrigen spezifischen Wachstumsraten. Höhere Wachstumsraten können daher nur mit steigendem  $D$  und der damit erhöhten Nährstoffbereitstellung realisiert werden. Diese erfordern jedoch auch eine zunehmende Photonenerverfügbarkeit pro Zelle. Oberhalb eines Schwellenwertes von  $D$  kommt es daher so lange zu einer Abnahme der Biomassekonzentration, bis die Photonenerverfügbarkeit ausreicht, um das höhere  $\mu$  zu realisieren. Bei den in Abbildung 4-1 A gezeigten experimentellen Daten ist dieser Punkt ab einer Verdünnungsrate von  $D = 0,3 \text{ d}^{-1}$  erreicht. Bei den zuvor geringen Verdünnungsraten ( $D \leq 0,2 \text{ d}^{-1}$ ), liegt die BTM-Konzentration aufgrund der limitierten Nährstoffverfügbarkeit in einem konstanten Bereich von  $\sim 4000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . Eine Erhöhung von  $D$  führt zu einer Abnahme der Bio-trockenmasse-Konzentration. Gleichzeitig steigt durch die Reduktion der BTM die Nährstoffverfügbarkeit pro Zelle, wodurch Nährstofflimitierungen reduziert oder aufgehoben werden und eine Veränderung der makromolekularen Zusammensetzung hervorrufen (siehe Abbildung 4-1 B). Mittlere Verdünnungsraten ( $0,3 \text{ d}^{-1} \leq D \leq 0,6 \text{ d}^{-1}$ ) sind daher durch ein Zusammenspiel aus Nährstoff- und Lichtlimitierung gekennzeichnet. Bei hohen Verdünnungsraten ( $D \geq 0,7 \text{ d}^{-1}$ ) wird

der Lichteinfluss dominant und definiert damit die maximale spezifische Wachstumsrate, die unter den gegebenen Bedingungen erreicht werden kann.



A



B

Abbildung 4-1: Charakterisierung der Biotrockenmasse von *C. vulgaris* während einer kontinuierlichen Kultivierung in einem synthetischen Abwasser mit zunehmender Verdünnungsrate  $D$ .  $D_{Hell}$  wurde in  $0,1 d^{-1}$ -Schritten zwischen  $D_{Hell} = 0,0-1,0 d^{-1}$  erhöht,  $D_{Nacht}$  wurde jeweils auf 10 % von  $D_{Hell}$  reduziert. A: Intrazellulärer N-Gehalt der Algenbiomasse ( $q_{N,gemessen,BTM}$ ) zusammen mit der Stickstoff-Aufnahmerate ( $r_{N,BTM}$ ) und der Photonen-Absorptionsrate ( $r_{Ph,abs,BTM}$ ) sowie der BTM-Konzentration. B: Makromolekulare Zusammensetzung der Mikroalgenzellen (Gehalte an Protein, Kohlehydraten, Pigmenten, Nukleinsäuren sowie Lipiden). Der gemessene Wert für  $q_{N,gemessen,BTM}$  für  $D = 0,7 d^{-1}$  wurde als Ausreißer deklariert.

Bei Anwendung geringer Verdünnungsraten wird überschüssiges Licht in der nicht-limitierenden Photosynthese zur Bildung und Akkumulation von Speicherstoffen (Kohlenhydra-

te + Lipide) genutzt, wodurch die Biomasse durch einen Gehalt an Energiespeichern von bis zu 70 %<sub>BTM</sub> charakterisiert ist. Kein Stickstoff oder Phosphor wurden im Reaktorausfluss nachgewiesen, weshalb eine Co-Limitierung beider Nährstoffe anzunehmen ist. Zur Aufrechterhaltung der von außen aufgezwungenen Wachstumsrate kommt es für  $D \geq 0,3 \text{ d}^{-1}$  zu einer Abnahme von  $c_{\text{BTM}}$ , weshalb die spezifische Photonenverfügbarkeit steigt. Mit zunehmender Verdünnungsrate sinkt die Stickstoff-Limitierung, wodurch der intrazelluläre N-Gehalt sowie die spezifische Stickstoff-Aufnahmerate zunehmen. Die spezifische Photonenabsorptionsrate  $r_{\text{Ph,abs,BTM}}$  nimmt im Bereich zwischen  $0,3 \text{ d}^{-1} \leq D \leq 0,6 \text{ d}^{-1}$  linear zu, zur Bildung eines Grammes neuer Biomasse wird hier also immer dieselbe Menge an Photonen benötigt. Ab  $D = 0,5 \text{ d}^{-1}$  ist ein reduzierter Kohlehydratgehalt von  $\sim 20 \text{ \%}_{\text{BTM}}$  messbar, diese Wachstumsrate markiert den Umschlagpunkt der beiden Limitierungszustände Licht und Nährstoffe. Algenzellen bei hohen Verdünnungsraten ( $D \geq 0,7 \text{ d}^{-1}$ ) sind durch einen stabilen N-Gehalt  $q_{\text{N,gemessen,BTM}}$  von  $\sim 7,75 \text{ \%}_{\text{BTM}}$  gekennzeichnet. Das schnelle Wachstum erfordert eine hohe Energieversorgung für die Mikroalgenzellen, repräsentiert und gewährleistet durch einen Anstieg von  $r_{\text{Ph,abs,BTM}}$  für  $D \geq 0,8 \text{ d}^{-1}$ .

Für  $D \geq 0,6 \text{ d}^{-1}$  ist mit zunehmenden  $D$  ein Anstieg der residualen N Konzentration im Reaktorausfluss messbar, wohingegen die Phosphor-Konzentration für alle Verdünnungsraten unterhalb der Nachweisgrenze lag. Aufgrund der abnehmenden Biomassekonzentration ist trotz steigender spezifischer Aufnahme ( $r_{\text{N,BTM}}$ ) die Obergrenze der volumetrischen N-Aufnahme des Systems erreicht. Die vollständige P-Aufnahme ist durch die Fähigkeit von *C. vulgaris* zur intrazellulären Phosphorspeicherung in Phosphat Granula (*luxury uptake*) erklärbar. Das im synthetischen Abwasser herrschende molare N:P Verhältnis betrug 9:1 und liegt damit wesentlich unterhalb des für Zellen postulierten Redfield Verhältnisses von 16:1 (Geider und La Roche 2002) und zeigt die Flexibilität von Mikroalgen zur Anpassung an variable Umweltbedingungen. Die sich daraus ergebenden Konsequenzen der Nährstoffaufnahmekapazität für einen kontinuierlichen Abwasseraufbereitungsprozess werden in Kapitel 5 erörtert.

Für alle getesteten Verdünnungsraten wurde zudem die zugehörige Dunkelphase beprobt. Während der Nachtphase war bei allen Verdünnungsraten eine konstante BTM-Konzentration bzw. ein leichter Anstieg zu beobachten. Die Reduktion der Biomasse während der Dunkelphase wird in der Literatur positiv mit dem Stärkegehalt der Mikroalgenzelle korreliert (León-Saiki et al. 2017; Torzillo et al. 1991). Dieser Trend ist auch an den Messdaten erkennbar, welche in Abbildung 4-2 exemplarisch für die Verdünnungsraten  $D_{\text{Hell}} = 0,4 \text{ d}^{-1}$  (A) sowie  $D_{\text{Hell}} = 0,7 \text{ d}^{-1}$  (B) gezeigt sind. Aus der Literatur ist ferner bekannt, dass intrazelluläre Kohlehydratspeicher für anabole Aktivitäten bei Abwesenheit von Licht genutzt werden können. Die Abnahme der Biomasse wird in der Praxis oft negativ beurteilt. Die genannten Befunde finden bislang wenig Beachtung und sollen hier erstmalig aktiv für die Prozessführung und Optimierung genutzt werden. Darüber hinaus zeigen die Daten des vorliegenden Experimentes einen Einfluss der Nährstoffverfügbarkeit auf die Stoffwechselaktivitäten während der Nacht.

Bei starker N-Limitierung ( $D = 0,0-0,3 \text{ d}^{-1}$ ) findet keine Proliferation oder Proteinsynthese statt, einhergehend mit einem konstanten Gehalt an Speicherkomponenten von  $\sim 62-68 \text{ \%}_{\text{BTM}}$ . Als einzige metabolische Aktivität ist die Umwandlung von intrazellulären Kohlehydraten als kurzfristiger Energiespeicherstärke zu Lipiden als Langzeitspeicher zu beobachten. Wird der minimale Stickstoffbedarf der Algenzellen abgedeckt ( $D = 0,4-0,6 \text{ d}^{-1}$ ), teilen sich die Mikroalgenzellen auf Kosten des Kohlehydrat-Energiespeichers (Abbildung 4-2, A). Bei N-Überschuss

im Medium ( $D = 0,7-1,0 \text{ d}^{-1}$ ), ist nach der Zellteilung die Synthese von Proteinen messbar (Abbildung 4-2 B). Die Zellteilung wird für alle getesteten Verdünnungsraten zumeist etwa 2 h nach Beginn der Nachtphase vermutet. Verschiedene Studien konnten diese Anpassung des Zellzyklus an Licht- und Dunkelphasen bereits nachweisen (Kato et al. 2019). Außerdem deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Stoffwechselaktivitäten bei allen angewandten Verdünnungsraten nach etwa 6 Stunden Dunkelheit abnehmen. Zusammenfassend lassen sich drei wesentliche Ergebnisse feststellen: (i) unter N-Limitierung wird der vorübergehende Energiespeicher Stärke während der Abwesenheit von Licht in Lipide umgewandelt, (ii) der Kohlenhydratpuffer der Mikroalgenzellen kann veratmet werden, um Energie für die Proteinsynthese in der Dunkelperiode zu liefern, wenn eine ausreichende N-Versorgung gegeben ist und (iii) die N-Aufnahme findet auch bei Abwesenheit von Licht statt. Außerdem findet die Zellteilung vermutlich etwa 2 Stunden nach Beginn der Dunkelphase statt.

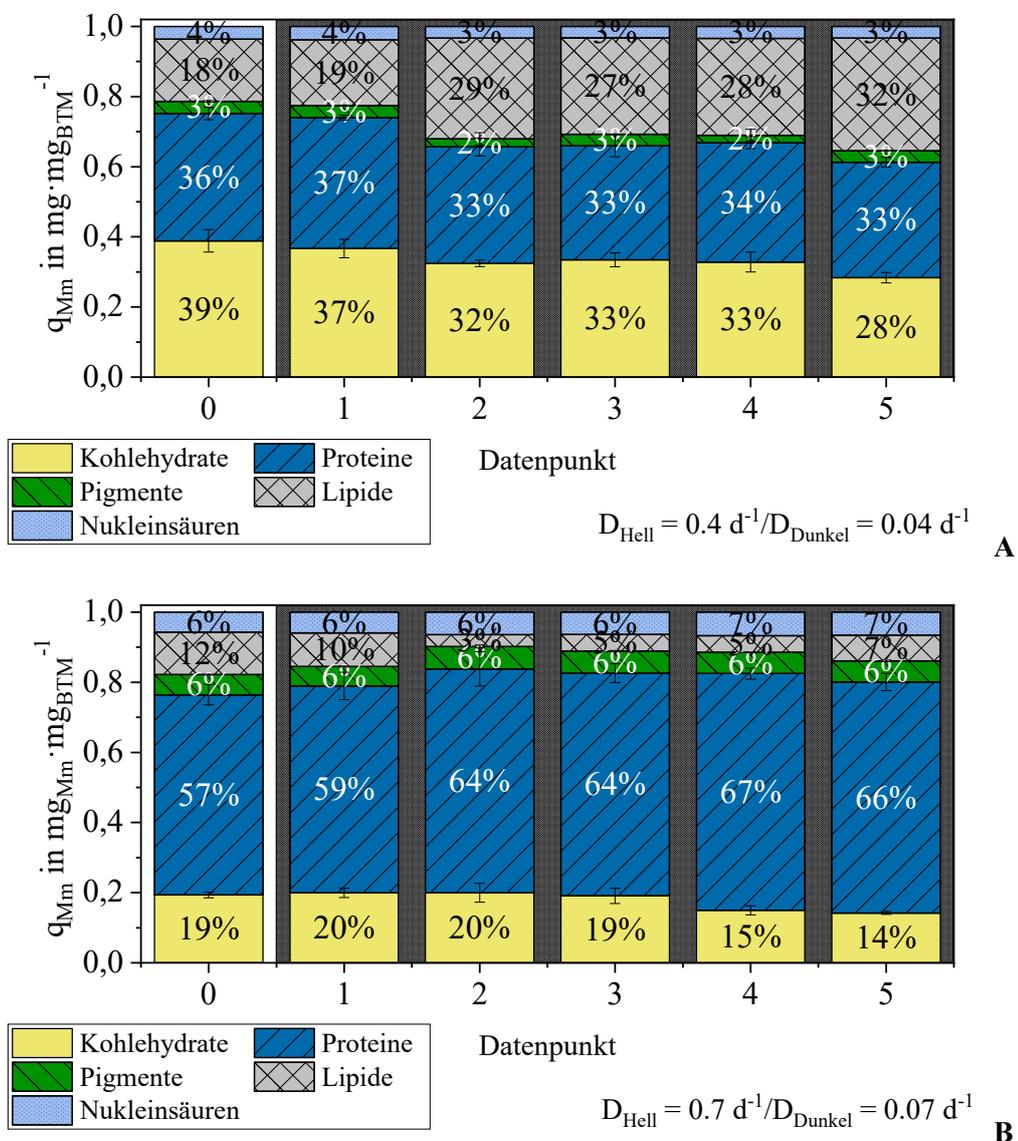


Abbildung 4-2: Makromolekulare Zusammensetzung der Biotrockenmasse von *C. vulgaris* während der Nachtphase einer kontinuierlichen Kultivierung in einem synthetischen Abwasser. Exemplarisch sind die Daten für die Verdünnungsraten  $D_{\text{Hell}} = 0,4 \text{ d}^{-1}$  und  $D_{\text{Hell}} = 0,7 \text{ d}^{-1}$  gezeigt.

Wird leicht stickstofflimitierten Zellen bei einer Verdünnungsrate von  $D_{\text{Hell}} = 0,4 \text{ d}^{-1}$  zu Beginn der Nachtphase Stickstoff zur Verfügung gestellt, so ist eine N-Aufnahme deutlich messbar (Reduktion von  $c_{\text{N,Medium}}$  um  $\sim 41 \%$ ) während der ersten 6 Stunden der Nacht. Diese geht einher mit einer Reduktion des intrazellulären Kohlehydrat-Gehaltes sowie der Synthese von Proteinen nach der Zellteilung.

### 4.1.2 Modell des Mikroalgenstoffwechsels und Konzept der aktiven Biomasse

Die Ergebnisse des vorhergehenden Kapitels demonstrieren die Anpassung der makromolekularen Zusammensetzung einer Mikroalgenzelle in Abhängigkeit des Versorgungs- oder Limitierungszustandes bezüglich Lichts und Nährstoffen. Dabei werden unter ungünstigen Umweltbedingungen Speichercomponenten wie Stärke und/oder Lipide aus für das Wachstum überschüssiger Lichtenergie synthetisiert. Diese Speicher sind wasserfreie Polymere mit einem hohen Kohlenstoffanteil, wodurch sie das Trockengewicht einer Zelle – und damit der Biotrockenmasse – beeinflussen. Die Zunahme der Biotrockenmasse-Konzentration einer Mikroalgenkultur kann dementsprechend neben der Zunahme der Zellzahl und der Zellgröße auch durch die Akkumulation von Speichercomponenten hervorgerufen werden. Eine Unterscheidung zwischen aktiv teilenden und Speicher-akkumulierenden Zellen kann lediglich durch die begleitende Quantifizierung der Zellzahl erfolgen.

Für die Modellierung von Bioprozessen wurde der Begriff der aktiven Biomasse (ABM) eingeführt, um die Menge an metabolisierenden Zellen in Schlämmen zu ermitteln. Dieses Konzept wurde in dieser Arbeit erstmals formal und berechenbar definiert. Bei der Übertragung des Konzeptes auf Mikroalgen in definierter Kultur wird darunter aktuell die leicht lichtlimitierte, aktiven Stoffwechsel betreibende Zelle ohne Speichercomponenten (Stärke und Lipide) verstanden. Lipide und Polysaccharide werden dementsprechend virtuell in funktionelle (hauptsächlich Strukturgebende) und speichernde Fraktionen unterteilt. Entsprechend besteht die aktive Algenzelle hauptsächlich aus den Makromolekülen Proteine, Nucleinsäuren (DNA und RNA), Pigmenten sowie Strukturkohlehydraten und Membranlipiden. Dieses Konzept stellt ein wichtiges Werkzeug in der Interpretation von Kultivierungsdaten dar. So ist die Aufnahme von Nährstoffen an aktiv metabolisierende Zellen gekoppelt und ist bei einer Aussage über die Kapazität von Mikroalgen zu deren Aufnahme beispielsweise im Bereich der Abwasserreinigung notwendig.

Blanken et al. 2016 stellten ein kinetisches Modell zum Mikroalgenwachstum vor, in welchem zwischen drei generellen Prozessen unterschieden wird: der Bildung von energiereichen C-Körpern während der Photosynthese, die Umwandlung dieser organischen Energiequellen in chemische Energie (ATP) in den Mitochondrien im Zuge der zellulären Atmung (Respiration) sowie der Neubildung von Biomasse im Anabolismus. Das vorgestellte Modell ist in Abbildung 4-3 zusammengefasst, wobei es um zwei Aspekte erweitert wurde. Zunächst ist die Fähigkeit einiger Mikroalgenspezies zur Akkumulation von Phosphat in sogenannten Phosphat-Granula (P-Granula) berücksichtigt. Zudem wird die Speicherung von für das Wachstum überschüssiger Lichtenergie (Photonen), vereinfacht in Form von Stärke integriert. Dieser Puffer erlaubt die teilweise Entkopplung von Photosynthese und Metabolismus/Anabolismus durch den Auf- und

Abbau von Stärke. Im Modell sind vier Limitierungen berücksichtigt, welche die Komponenten bzw. Substrate Licht und  $\text{CO}_2$  sowie die Nährstoffe Phosphor und Stickstoff umfassen, welche von der Mikroalgenzelle aus der Umwelt aufgenommen werden. Die Limitierungszustände wurden in Anlehnung an eine potenzielle Anwendung in der Abwasserreinigung gewählt. Weiterhin sind die Stoffwechselwege zum Teil stöchiometrisch gekoppelt. Eine detaillierte Beschreibung des Modells ist im Anhang in Abschnitt 8.6.1 und 8.6.2 zu finden.

Die Berücksichtigung von Speicherstoffen stellt also den wesentlichen Unterschied zwischen aktiver und Biotrockenmasse dar. Die Synthese ebendieser Komponenten entspricht der zentralen Anpassung der makromolekularen Zusammensetzung der Biotrockenmasse. Durch eine Subtraktion der aktiven Biomasse können diese Speicherkomponenten quantifiziert werden.

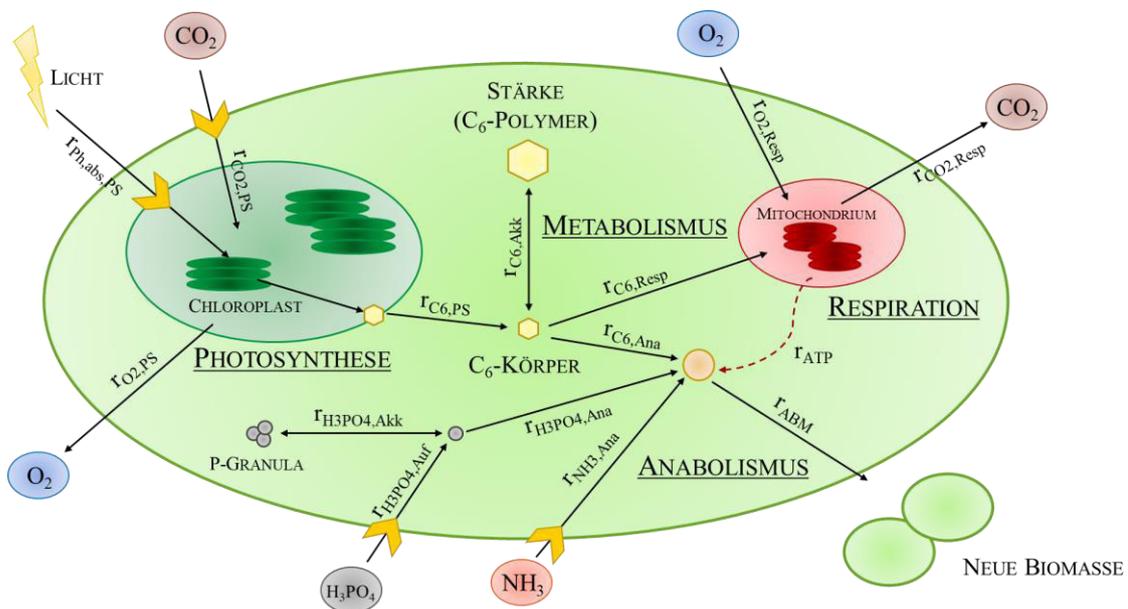


Abbildung 4-3: Vereinfachtes Modell des Mikroalgenstoffwechsels, welches drei Knoten umfasst: Photosynthese, Atmung und Anabolismus. Stoffwechselaktivitäten werden durch spezifische Raten  $r$  abgebildet (PS – Photosynthese, Ph – Photon, abs – absorbiert, Akk – Akkumulation, Resp – Respiration (Atmung), Ana – Anabolismus, BM – Biomasse, ABM – aktive Biomasse, Auf – Aufnahme). Quelle: eigene Darstellung.

Für die Bestimmung der Zusammensetzung der aktiven Mikroalgenzelle wurden verschiedene Annahmen getroffen, welche auf Messdaten sowie Literaturwerten basieren. Für ein schnelles, unlimitiertes Wachstum ohne Akkumulation von Speicherstoffen wurde institutsintern ein minimaler Kohlehydrat-Gehalt von 14 % ermittelt, dieser Wert wurde entsprechend als Kohlehydratfraktion der aktiven Biomasse ( $q_{\text{Kohlehydrat,ABM,est}}$ ; est: abgeschätzter Wert, von engl. *estimated*) gesetzt. Außerdem wird ein konstanter Lipidgehalt der ABM ( $q_{\text{Lipid,ABM,est}}$ ) von 5 % angenommen. Der Proteingehalt der aktiven Biomasse  $q_{\text{Protein,ABM,est}}$  wurde direkt aus dem normierten Gehalt der BTM ( $q_{\text{Protein,BTM,ber}}$ ) berechnet. Ebenso wurde der Pigmentgehalt  $q_{\text{Pigment,ABM,est}}$  aus  $q_{\text{Pigment,BTM,ber}}$  bestimmt. Entsprechend der Biotrockenmasse wurde der Gehalt an Nucleinsäuren als 10 % der Proteinfraction abgeschätzt. Tabelle 4-1 fasst die Zusammensetzung

einer exemplarischen, theoretischen *Chlorella*-Zelle unter Berücksichtigung der genannten Annahmen zusammen.

Tabelle 4-1: Makromolekulare und elementare Zusammensetzung der Hauptkomponenten einer aktiven *Chlorella*-Zelle. Die berechneten Werte liegen im Bereich von Literaturdaten aus Inomura et al. 2020, Ågren 2004 sowie Geider und La Roche 2002.

<b>Makromolekül</b>	<b>q<sub>C,Mm</sub></b>	<b>q<sub>N,Mm</sub></b>	<b>q<sub>P,Mm</sub></b>	<b>q<sub>Mm,ABM</sub></b>
<i>Proteine</i>	0,533	0,158	0,000	0,690
<i>Nukleinsäuren</i>	0,340	0,155	0,091	0,070
<i>(Phospho-)Lipide</i>	0,640	0,000	0,043	0,050
<i>Kohlehydrate</i>	0,400	0,000	0,000	0,140
<i>Pigmente (Chlorophyll)</i>	0,740	0,063	0,000	0,050
<i>Aktive Biomasse</i>	0,523	0,0922	0,0127	1,000

Dabei wurde weiterhin berücksichtigt, dass die Summe, der in der ABM enthaltenen Makromoleküle, gleich 1 ergibt (Gleichung (4.1)). Für die Interpretation der bereits gezeigten Messdaten mittels des Konzeptes der aktiven Biomasse wurden die auf 100 % normierten Messwerte der Gehalte der einzelnen Makromoleküle an der Biotrockenmasse (vgl. Abschnitt 2.6.1) über einen Normfaktor  $f_{\text{norm}}$  umgerechnet (Gleichung (4.2)). Die Gehalte  $q_{\text{Kohlehydrat,ABM,est}}$  und  $q_{\text{Lipid,ABM,est}}$  sind auf die bereits beschriebenen Werte festgelegt.

$$\sum q_{\text{Mm,ABM,est}} = 1 \quad (4.1)$$

$$q_{\text{Mm,ABM,est}} = q_{\text{Mm,BTM,ber}} \cdot f_{\text{norm}} \quad (4.2)$$

Der Normfaktor  $f_{\text{norm}}$  kann dabei wie folgt durch Lösen der Gleichung (4.2) und unter Annahme der konstanten Werte für strukturelle Kohlehydrate und Lipide der aktiven Biomasse bestimmt werden als:

$$f_{\text{norm}} = \frac{1 - q_{\text{Kohlehydrat,ABM,est}} - q_{\text{Lipid,ABM,est}}}{q_{\text{Protein,BTM,ber}} + q_{\text{Nukleinsäuren,BTM,ber}} + q_{\text{Pigment,BTM,ber}}} \quad (4.3)$$

Die virtuellen Gehalte an Speichercomponenten ( $q_{\text{Kohlehydrate,Speicher,est}}$  und  $q_{\text{Lipid,Speicher,est}}$ ) werden gemäß der Gleichungen (4.4) und (4.5) bestimmt.

$$q_{\text{Kohlehydrat,Speicher,est}} = \frac{(1 - q_{\text{Lipid,ABM,est}}) \cdot q_{\text{Kohlehydrat,BTM,ber}} - (1 - q_{\text{Lipid,BTM,ber}}) \cdot q_{\text{Kohlehydrat,ABM,est}}}{q_{\text{Protein,BTM,ber}} + q_{\text{Nukleinsäuren,BTM,ber}} + q_{\text{Pigment,BTM,ber}}} \quad (4.4)$$

$$q_{\text{Lipid,Speicher,est}} = \frac{(1 - q_{\text{Kohlehydrat,ABM,est}}) \cdot q_{\text{Lipid,BTM,ber}} - (1 - q_{\text{Kohlehydrat,BTM,ber}}) \cdot q_{\text{Lipid,ABM,est}}}{q_{\text{Protein,BTM,ber}} + q_{\text{Nukleinsäuren,BTM,ber}} + q_{\text{Pigment,BTM,ber}}} \quad (4.5)$$

Die Konzentration der aktiven Biomasse kann zuletzt aus der Biotrockenmasse-Konzentration nach Gleichung (4.6) berechnet werden.

$$c_{ABM} = \frac{c_{BDM}}{1 + q_{\text{Kohlehydrat,Speicher,est}} + q_{\text{Lipid,Speicher,est}}} \quad (4.6)$$

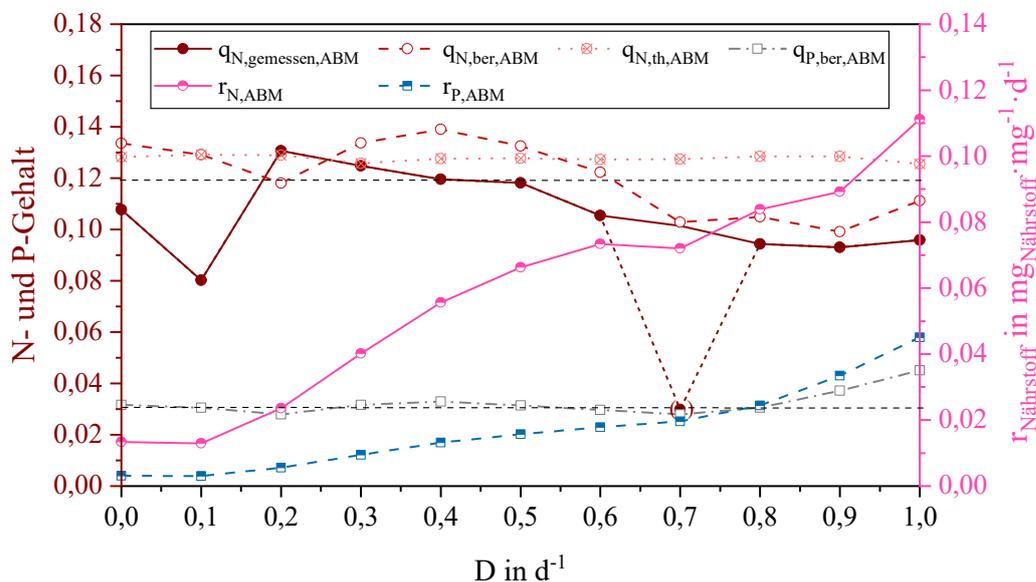
### 4.1.3 Makromolekulare Zusammensetzung der aktiven Biomasse bei Variation der Durchflussrate

Gemäß dem Konzept der aktiven Biomasse ist die Zusammensetzung einer sich aktiv teilenden Mikroalgenzelle im Wesentlichen konstant. Der Auf- und Abbau von Speicherkomponenten führt zu einer scheinbaren Verdünnung der Gehalte an Proteinen und Pigmenten – vor allem bei Nährstoff-limitiertem Wachstum mit Lichtüberschuss. Die Nichtbeachtung dieses Umstands führt in der Literatur oft zu missverständlichen Angaben des Proteingehaltes von Zellen. Die Daten in Abschnitt 4.1.1 zeigen einen Wechsel im Limitierungszustand der Mikroalgen in Abhängigkeit der Durchflussrate: so sind die Mikroalgenzellen für  $D \geq 0,7 \text{ d}^{-1}$  ausschließlich Licht limitiert, Nährstofflimitierungen beeinflussen die Biomassekonzentration und Zusammensetzung für  $D \leq 0,6 \text{ d}^{-1}$ . Wird das Konzept der aktiven Biomasse zur Dateninterpretation angewandt, so wird die maximale Konzentration an aktiver Biomasse im Zustand nicht-limitierenden Lichts durch die verfügbare Menge an Nährstoffen bzw. dem Gehalt dieser Elemente in der Algenzelle definiert. Infolgedessen bleibt die Konzentration der aktiven Biomasse – in Analogie zu heterotrophen Kulturen – für  $D \leq 0,6 \text{ d}^{-1}$  annähernd konstant (Abbildung 4-4 B). Um hohe Durchflussraten von  $D \geq 0,7 \text{ d}^{-1}$  aufrechtzuerhalten, benötigen Mikroalgenzellen eine spezifische Photonenmenge pro Zelle (Photonenverfügbarkeit). Bei konstanter Lichtintensität bedeutet dies eine Reduktion der aktiven Biomassekonzentration, bis dieser Bedarf gedeckt ist. Dieses Systemverhalten markiert den Hauptunterschied zwischen phototrophen und heterotrophen Kultivierungen.

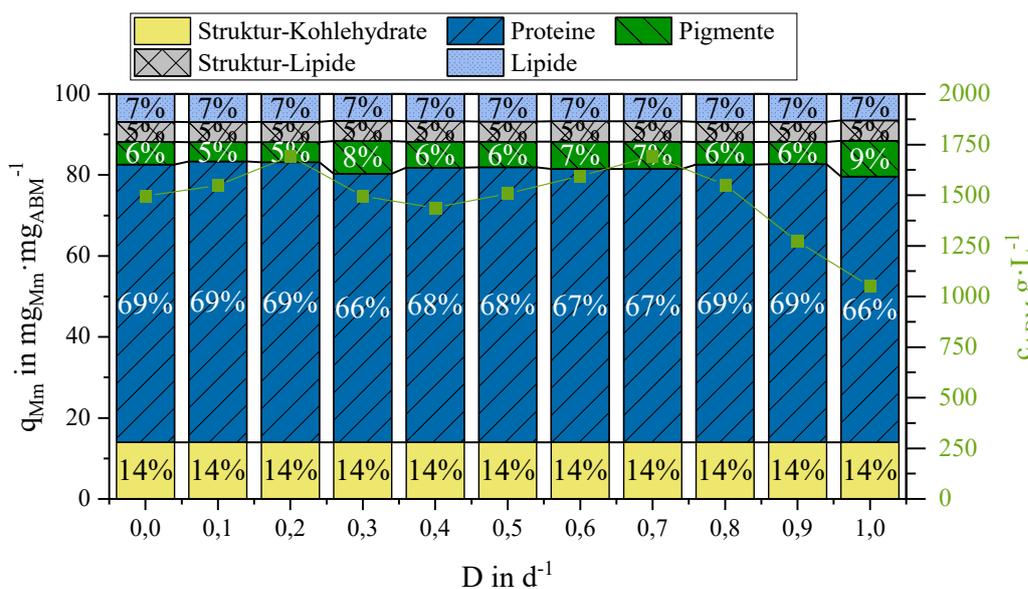
Im Gegensatz zu Biotrockenmasse sind nur geringe Schwankungen in der makromolekularen Zusammensetzung der aktiven Biomasse zu beobachten (Abbildung 4-4 B). Ein Anstieg des Pigmentgehaltes auf bis zu 9 %<sub>ABM</sub> geht mit dem hohen Energiebedarf bei schnellem Zellwachstum einher. Ein intrazellulärer Proteingehalt von 66-69 %<sub>ABM</sub> deutet auf einen konstanten Proteinbedarf gesunder Zellen hin.

Der intrazelluläre Stickstoffgehalt ( $q_N$ ) wurde auf drei voneinander unabhängigen Wegen bestimmt ( $q_{N,\text{gemessen,ABM}}$ ,  $q_{N,\text{ber,ABM}}$  und  $q_{N,\text{th,ABM}}$  siehe Abschnitt 2.6.2.3). Obwohl die Werte aus Messungen unterschiedlicher Genauigkeit stammen, zeigen alle N-Gehalte ein ähnliches Muster: Schwankungen um einen Mittelwert von  $\sim 11,94 \text{ \%}_{ABM}$  intrazellulärem Stickstoff (Abbildung 4-4 A, schwarze gestrichelte Linie), gleichbedeutend mit einem konstanten Stickstoffbedarf der Mikroalgenzellen (ohne N-freie Speichermoleküle), der unabhängig von den umgebenden Nährstoffkonzentrationen gedeckt werden muss. Darüber hinaus ist eine Speicherung von Stickstoff auch bei hohen N-Konzentrationen nicht möglich, da sonst ein Anstieg des Gehaltes nachweisbar wäre. Der intrazelluläre Phosphorgehalt ( $q_{P,\text{ber,ABM}}$ ) wurde aus den P-Konzentrationen von ein und aus fließendem Medium bestimmt. Für  $D \leq 0,8 \text{ d}^{-1}$  ist ein konstanter Gehalt von  $\sim 3,05 \text{ \%}_{ABM}$  ersichtlich (Abbildung 4-4 A, schwarze Strich-Punkt-Linie), steigt

aber bei sehr hohen D's auf bis zu 4,5 %<sub>ABM</sub> an. Dies ist möglicherweise durch den zunehmenden Gehalt an ribosomaler RNA erklärbar.



A



B

Abbildung 4-4: Charakterisierung der aktiven Biomasse von *C. vulgaris* während einer kontinuierlichen Kultivierung in einem synthetischen Abwasser mit zunehmender Verdünnungsrate D.  $D_{\text{Hell}}$  wurde in 0,1 d<sup>-1</sup>-Schritten zwischen  $D_{\text{Hell}} = 0,0-1,0$  d<sup>-1</sup> erhöht,  $D_{\text{Dunkel}}$  wurde jeweils auf 10 % von  $D_{\text{Hell}}$  reduziert. A: Intrazellulärer N- und P-Gehalt der Algenbiomasse ( $q_N$  und  $q_P$ ) sowie Nährstoff-Aufnahmeraten ( $r_{N,ABM}$  und  $r_{P,ABM}$ ) und der ABM-Konzentration. B: Makromolekulare Zusammensetzung der aktiven Mikroalgenzellen (Gehalte an Protein, Kohlehydraten, Pigmenten, Nukleinsäuren sowie Lipiden). Der gemessene Wert für  $q_{N,gemessen,ABM}$  für  $D = 0,7$  d<sup>-1</sup> wurde als Ausreißer deklariert.

Die Anwendung des Konzeptes der aktiven Biomasse auf die gewonnenen Messdaten konnte einen wertvollen Einblick in den Mikroalgenstoffwechsel unter verschiedenen Umweltbedin-

gungen bzgl. Nährstoff- und Lichtverfügbarkeit geben. Die Erkenntnisse wurden als Grundlage für die Konzeption einer Prozessstrategie für eine kontinuierliche 24 h Abwasseraufbereitung mit Mikroalgen eingesetzt, welche in Kapitel 5 vorgestellt wird.

## 4.2 Kultivierung von Mikroalgen in realem Abwasser

Abwässer können über ihren chemischen oder biologischen Sauerstoffbedarf (CSB, BSB), die enthaltenen Konzentrationen an Stickstoff (TN von engl. *total nitrogen*) oder Phosphat (TP von engl. *total phosphorus*), dem Gehalt an Schwermetallen oder Spurenelementen, ihrem pH-Wert, Feststoffgehalt oder dessen Trübung eingeteilt und verglichen werden (Nagarajan et al. 2020). Diese Charakteristika sind für jedes Abwasser je nach Herkunft sehr unterschiedlich, wodurch es nahezu unmöglich ist, eine Art „Standard“-Abwasser zu definieren. Eine Vielzahl an Studien zum Thema Mikroalgen in der Abwasseraufbereitung bedient sich dennoch sogenannter synthetischer Abwässer, deren Nährstoffkonzentrationen auf reale Abwässer abgestimmt sind (vgl. Reviews von Abdelfattah et al. 2023, Li et al. 2019 oder Chai et al. 2021). Eine solche Imitation eines realen Abwassers zu Versuchszwecken hat Vorteile – neben einer nahezu unendlichen Verfügbarkeit ist auch eine hohe Reproduzierbarkeit für die Experimente gegeben. Zudem erlauben synthetische Abwässer die gezielte Untersuchung spezifischer Aspekte des Abwasseraufbereitungsprozesses, wie beispielsweise der Nährstoffaufnahme. Nichtsdestotrotz bleibt die Nachbildung der exakten Zusammensetzung eines realen Abwassers eine Herausforderung, da diese Komponenten in Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze enthalten, welche dennoch einen wesentlichen Einfluss auf den Reinigungsprozess haben können. Nicht nur die biologische Reinigungseffizienz durch die Mikroalgen kann zwischen synthetischem und realem Abwasser variieren. Auch folgende oder begleitende Prozessschritte wie etwa der Einsatz von Membranfiltration zur Algenabtrennung (Stichwort Membran-Fouling, siehe Abschnitt 3.4.2) werden durch die in realen Abwässern enthaltenen Substanzen beeinflusst.

In den folgenden Kapiteln sind die Ergebnisse zweier Studien gezeigt, welche die Nährstoffaufnahme von Mikroalgen aus einem realen sekundären Abwasser untersuchen. Das Abwasser wurde vor der Verwendung als Kulturmedium für die Algenzellen in einem anaeroben Membranbioreaktor behandelt, wodurch die Entfernung der C-Quellen stattfand. Zunächst ist die Machbarkeit eines mehrstufigen, sogenannten „zero-Waste“-Prozesses zur Aufbereitung eines Industrieabwassers im Verlauf eines Jahres im Außenbereich gezeigt, wobei verschiedene Mikroalgenpezies zur Eliminierung von N und P eingesetzt wurden. Für die gezielte Untersuchung der Eignung der Algenstämme fanden Laborversuche statt, welche neben der Nährstoffaufnahme auch das Potential für eine Valorisierung der entstehenden Biomasse evaluierten.

### 4.2.1 Semi-kontinuierliche Kultivierung im Außenbereich

Die Aufarbeitung von Abwässern mittels Mikroalgen erfolgt häufig in mehrstufigen Prozessen, da z.B. die Eliminierung von C-Quellen durch heterotrophe Bakterien sehr effizient geschieht. Um einen möglichst nachhaltigen Prozess zu etablieren, ist es vorteilhaft, alle entstehenden Stoffströme nutzbar zu machen – so kann beispielsweise das während des Bakterienstoffwechsels entstandene CO<sub>2</sub> als Substrat für die Mikroalgenkultivierung dienen. Entsprechend dieser Idee wurde ein Konzept zur zweistufigen Aufbereitung eines industriellen Abwassers aus der Lebensmittelindustrie entwickelt. In einem ersten Schritt findet die Elimination von C-Quellen in einem anaeroben Membranbioreaktor mit Bakterien statt, während Mikroalgen in einem Photobioreaktor im darauffolgenden Schritt für die Entfernung von N und P aus dem Abwasser sorgen. Neben dem aus der anaeroben Kultivierung entstandenen Biogas kann der Klärschlamm über einen weiteren Prozessschritt der sogenannten hydrothermalen Carbonisierung weiter nutzbar gemacht werden. Insgesamt soll ein „zero-Waste“ Prozess etabliert werden, welcher alle anfallenden Stoffströme nutzt, um so eine CO<sub>2</sub> Bilanz von null zu erreichen. Die Umsetzung sowie die Machbarkeit dieses Systems zur kontinuierlichen Abwasseraufbereitung unter realen Bedingungen im Außenbereich (Wüste von Negev, Israel) im Laufe eines Jahres (vier Jahreszeiten) ist Gegenstand eines wissenschaftlichen Papers (DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146373>), welches im Literatur-Anhang (Kapitel 7.1) abgedruckt ist. Ein wesentlicher Bestandteil der Studie war eine Massenbilanz, welche die hohe Wiederfindung der Elemente C, N und P im Laufe des Prozesses zeigte und damit die Effektivität dieser Aufarbeitungsstrategie unterstreicht. Im Folgenden sind die relevantesten Ergebnisse mit Fokus auf die Mikroalgenkultivierung zusammengefasst.

Der eingesetzte anaerobe Membranreaktor (AnMBR) konnte 97 % des organischen Kohlenstoffs aus dem Abwasser entfernen, wobei ~70 % davon in Form von Biogas für eine weitere Nutzung zur Verfügung standen. Zudem wurden lediglich circa 10 % der Nährstoffe N und P aus dem Abwasser entfernt, weshalb das den AnMBR verlassende sekundäre Abwasser ein ideales Kulturmedium für die folgende Mikroalgenkultivierung darstellte. In der Gesamtbilanz des Prozesses wurden Stickstoff und Phosphor hauptsächlich in der gebildeten Algenbiomasse nachgewiesen (N: 76,6 %, P: 91,2 %). Die für die Abwasseraufbereitung getesteten Mikroalgenstämme *Coelastrrella* sp., *Desmodesmus* sp. und *Scenedesmus* sp. zeigten in allen Jahreszeiten geringfügige Unterschiede in Biomasseproduktivität und Nährstoffaufnahme, welche vermutlich deren natürlicher Habitate zuzuschreiben ist. Die Aufreinigungseffizienz durch die Mikroalgen wurde von der jeweiligen Jahreszeit (Temperatur, Lichtintensität und -dauer) sowie der Abwasserzusammensetzung beeinflusst. Die vollständige Aufreinigung des sekundären Abwassers entsprechend der gesetzlichen Vorgaben (N-Konzentration: <25 mg<sub>N</sub>·L<sup>-1</sup>, P-Konzentration: <5 mg<sub>P</sub>·L<sup>-1</sup>) erfolgte innerhalb von 2,5 (Sommer), 3 (Herbst) beziehungsweise 4,3 Tagen (Winter). Aufgrund von Schwankungen in der Abwasserzusammensetzung (zu geringe P-Beladung) war die Nährstoffaufnahme im Frühjahr unzureichend. Die Nährstoffaufnahme variierte saisonal bedingt zwischen 18-45 mg<sub>N</sub>·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> und ≤ 5 mg<sub>P</sub>·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>.

Das Konzept einer „zero-Waste“ Aufbereitung von industriellem Abwasser konnte erfolgreich demonstriert werden.

## 4.2.2 Semi-kontinuierliche Kultivierung unter Laborbedingungen

Werden Mikroalgen im Außenbereich kultiviert, so unterliegt ihr Wachstum den natürlichen Schwankungen, welchen die Kultur ausgesetzt ist. Dementsprechend stehen die gewonnenen Daten unter dem Einfluss von sowohl der Mikroalgenbiologie als auch den umgebenden Umweltbedingungen. Soll die Nährstoffaufnahme verschiedener Mikroalgenpezies untersucht werden, sind daher Versuche unter Laborbedingungen zu bevorzugen, da sie kontrollierte Bedingungen garantieren und Unterschiede in Wachstum und Nährstoffnutzung auf die Natur der Spezies zurückgeführt werden können.

Für die Aufreinigung des bereits vorgestellten sekundären Abwassers (AnMBR Effluent) wurden zwei Mikroalgenpezies (*Coelastrrella* und *Desmodesmus*) zur Verfügung gestellt. Die Algenstämme wurden aus natürlichen Quellen in Israel und Bremen isoliert und sind somit an unterschiedliche klimatische Bedingungen angepasst. Für beide Stämme sollte die Nährstoffaufnahme während einer semi-kontinuierlichen Kultivierung im Labormaßstab evaluiert werden. Die so erzeugte Biomasse wurde im Anschluss hinsichtlich ihrer makromolekularen und elementaren Zusammensetzung untersucht, um deren Potential für eine Valorisierung der Biomasse zu beurteilen. Die Ergebnisse der Versuche wurden in Form eines wissenschaftlichen Papers (DOI: 10.1016/j.seppur.2022.120744) veröffentlicht welches im Literatur-Anhang in Kapitel 7.2 abgedruckt ist. Das als Kulturmedium eingesetzte AnMBR Effluent ist durch hohe Nährstoffkonzentrationen ( $147 \text{ mg}_N \cdot \text{L}^{-1}$  und  $7,4 \text{ mg}_P \cdot \text{L}^{-1}$  beziehungsweise  $10 \text{ mg}_P \cdot \text{L}^{-1}$ ) charakterisiert. Die semi-kontinuierliche Kultivierung fand über 24 Tage in sechs konsekutiven Zyklen (0-5) mit einer HRT von  $\sim 8$  Tagen statt, wobei am Ende eines jeden Zyklus jeweils ein Teil des Kulturvolumens abgenommen und durch frisches Abwasser ersetzt wurde. In den Zyklen 1-3 betrug das N:P Verhältnis 20:1, diese wurde in den Zyklen 4-5 auf 15:1 herabgesetzt. Folgend sind die wichtigsten Erkenntnisse zusammengefasst.

Beide Mikroalgenpezies zeichnen ein ähnliches Bild hinsichtlich des Wachstums sowie der Aufnahme von Stickstoff und Phosphor. Zu Beginn jedes Zyklus wurden die intrazellulären Gehalte an N und P bestimmt, diese lagen als Mittelwert beider Spezies bei  $\sim 7,5 \%_N$  bzw.  $\sim 2 \%_P$ , wobei jeweils ein leichter Anstieg in den Zyklen 4-5 im Vergleich zu den Zyklen 1-3 erkennbar ist. Auch direkt nach dem Medien austausch konnte bei beiden Spezies kein Phosphor im prozessierten Abwasser nachgewiesen werden. Beide genannten Aspekte untermauern eine ausgeprägte P-Limitierung der Mikroalgenzellen, welche nach der Erhöhung der P-Konzentration in den Zyklen 4-5 lediglich abgemildert wurde. Aufgrund dessen konnte während der Zyklen 1-3 keine vollständige Stickstoff-Aufnahme erzielt werden (74-94 % N-Aufnahme), zudem lag die mittlere spezifische Wachstumsrate  $\mu_{\text{mittel}}$  bei  $\sim 0,15 \text{ d}^{-1}$  für beide Spezies. Eine Reduktion des N:P Verhältnisses in Zyklus 4-5 führte zu einem Anstieg von  $\mu_{\text{mittel}}$   $0,185 \text{ d}^{-1}$  beider Algenstämme, allerdings konnte keine Verbesserung der Stickstoff-Aufnahme erreicht werden (76-78 % N-Aufnahme). Eine Analyse der makromolekularen Zusammensetzung ergab einen stabilen Proteingehalt beider Algenstämme von  $30,75 \%_{\text{BTM}}$  zwischen Kultivierungstag 8 und 16, Speicherstoffe (Lipide und Kohlehydrate) blieben ebenso konstant und lagen bei *Desmodesmus*  $43,5 \%_{\text{BTM}}$  im Vergleich zu  $38,5 \%_{\text{BTM}}$  bei *Coelastrrella* etwas höher. Ein Anstieg im Gehalt mehrfachungesättigter Fettsäuren ist bei beiden Spezies auf die Nährstofflimitierung

zurückzuführen. Die im sekundären Abwasser vorhandenen Schwermetalle wurden mit Ausnahme von Blei (Pb) lediglich in sehr geringen Mengen von den Mikroalgen absorbiert und nachgewiesen. Der hohe Protein- und Kohlehydratgehalt der erzeugten Biomasse beider Spezies ist damit für eine Valorisierung im Bereich der Futtermittel sowie als Ausgangsmaterial für die Bioenergieproduktion geeignet.

Aufgrund der geringen Unterschiede in sowohl Nährstoffaufnahme als auch makromolekularer Zusammensetzung sind beide getesteten Mikroalgenstämme gleichermaßen für die Aufreinigung des sekundären Abwassers geeignet. Die jeweiligen klimatischen Bedingungen eines potentiellen Einsatzortes haben bei der finalen Auswahl des Stammes daher Priorität.

# 5 Prozessstrategie für eine optimierte Nährstoffaufnahme der Abwasseraufbereitung mittels Mikroalgen

Im vorhergehenden Kapitel (Abschnitt 4.2.1) wurde ein Abwasseraufbereitungsprozess vorgestellt, welcher Mikroalgen als Teil der biologischen Reinigungsstufe einsetzt. Das mikroalgenbasierte Verfahren im Außenbereich konnte erfolgreich für die Reinigung eines Abwassers aus der Lebensmittelindustrie im Laufe eines Jahres etabliert werden. Die entsprechenden Versuche der Mikroalgenkultivierung wurden allerdings semi-kontinuierlich durchgeführt, wobei das von den Mikroalgen aufzureinigende sekundäre Abwasser am Tag getauscht wurde. Die kontinuierliche Kultivierung pausiert also während der Nacht, weshalb der entwickelte Prozess nur bedingt skalierbar ist, und für eine großtechnische Etablierung angepasst werden muss. Ein Fokus der vorliegenden Arbeit lag daher auf der kontinuierlichen Abwasseraufbereitung nicht nur während des Tags, sondern auch in der Nacht.

Mit dem Ziel einer mikroalgenbasierten Aufbereitung von Abwasser im 24 h-Betrieb, sollte zunächst eine theoretische Prozessstrategie entwickelt werden, welche eine flexible Anpassung an variable Lichtverhältnisse sowie unterschiedliche Nährstoffbeladungen des sekundären Abwassers berücksichtigt. Dabei werden zwei Freiheitsgrade einbezogen, mit welchen eine Beeinflussung des Aufbereitungsprozesses geschehen kann. Die Messwerte des vorhergehenden Kapitels 4.1 dienen dabei als Grundlage für die Berechnung der Machbarkeit eines solchen Prozesses. Versuche im Labor- und Pilotmaßstab sollten im Anschluss die vorgestellte Prozessstrategie auf ihre Umsetzbarkeit hin prüfen, wobei die beiden im Zuge der vorliegenden Arbeit entwickelten Filtrationsanlagen *Mini-Harvester* und *Harvester* eingesetzt werden sollten. Die Kopplung der jeweiligen Abtrenneinheit an ein Photobioreaktorsystem resultiert dabei in einem sogenannten Membran-Photobioreaktor (MPBR, siehe Kapitel 1.3.3.2).

Die Kombination aus Photobioreaktor und *Mini-Harvester* sollte für Versuche zur Validierung der zuvor entwickelten Prozessstrategie Anwendung finden. Dabei sollte vor allem die Zellrückführung als Werkzeug zur Beeinflussung der Nährstoffaufnahme während Hell- und Dunkelphasen im Detail untersucht werden.

Experimente im Pilotmaßstab mit sogenannten Phytobag-Photobioreaktoren im Außenbereich sollten die Anwendung der Strategie unter natürlichen Wetterbedingungen bei verschiedenen Jahreszeiten demonstrieren. Hierfür wurde das Prozessleitsystem (BioProCon, siehe Abschnitt 3.1.1.3) des *Harvesters* an die Prozessstrategie angepasst, sodass eine automatisierte Anpassung der Biomassekonzentration in den Phytobag-Reaktoren an variierende Umweltbedingungen und die dadurch beeinflusste Nährstoffaufnahme durch die Mikroalgenzellen stattfinden konnte.

## 5.1 Konzept der optimierten Abwasseraufbereitungsstrategie für einen 24 h Betrieb

Der Kopplung einer Membran an einen Photobioreaktor (Membran-Photobioreaktor, vgl. Abschnitt 1.3.3.2) mit dem Ziel der Zellrückhaltung oder -führung kann gegenüber der klassischen kontinuierlichen Kultivierung im Chemostaten (konstante Verdünnungsrate) eine verbesserte Nährstoffaufnahme durch die Entkopplung der Verweilzeit der Feststoffe (Zellen, SRT) und der flüssigen Phase (HRT) bewirken (vgl. Abschnitt 1.3.1.3). Zudem können HRTs oberhalb des Auswaschpunktes ( $\mu_{\max}$ ) angewandt werden, wodurch im Bereich der mikroalgenbasierten Abwasseraufbereitung beim Einsatz von Abwässern mit geringen Nährstoffbelastungen Nährstofflimitierungen vermieden werden und zudem die Kapazität des Klärsystems gesteigert wird. Wird eine externen Abtrenneinheit an einen Photobioreaktor gekoppelt, so kann die Rückführung von Zellen als Freiheitsgrad zur Beeinflussung eines Abwasseraufbereitungsprozess eingesetzt werden. Durch die Erhöhung der Biomassekonzentration im Reaktor sinkt die Nährstoffbelastung pro Zelle, wodurch eine vollständige Nährstoffaufnahme möglich wird. Dieser Effekt kann beispielsweise für die Elimination von Phosphor aus einem Abwasser genutzt werden, da dieser intrazellulär in Form von Granula gespeichert werden kann. Phosphor kann somit auch von nicht aktiv metabolisierenden Zellen aufgenommen werden, wobei hohe intrazelluläre Konzentrationen von bis zu 4-6 % erreicht werden können (vgl. Abschnitt 1.3.1.5). Da die zelluläre Aufnahme von Stickstoff hingegen dessen aktiven Einbau in aus der Photosynthese stammenden Kohlenstoffgerüsten bedingt, führt eine Erhöhung der Zellzahl nicht unbedingt zu einer verbesserten Stickstoffreduktion in einem Abwasser. Stickstoff wird als Bestandteil funktioneller Makromoleküle in neu gebildete aktive Biomasse eingebaut, deren intrazellulärer Stickstoffbedarf bzw. -gehalt ist dabei konstant und liegt bei 11,94 % (vgl. Abschnitt 4.1.3). Damit determiniert die Stickstoffkonzentration im Abwasser die maximale erreichbare bzw. minimal benötigte Konzentration an aktiver Biomasse bei einer vollständigen Stickstoffaufnahme. Ob diese Zellzahl realisiert werden kann, hängt von der spezifischen Photonenverfügbarkeit bzw. dem Gehalt an intrazellulären energiereichen Kohlenstoffspeichern (Stärke und Lipide) ab. Reichen die Energiespeicher der Zelle nicht für eine Zellteilung aus, so wird der Zellzyklus pausiert (vgl. Abschnitt 1.3.1.3) und damit die Nährstoffaufnahme gestoppt. Eine Erhöhung der Biomassekonzentration im PBR führt somit nicht zur gewünschten verbesserten Stickstoffaufnahme. Nichtsdestotrotz kann die Flexibilität der makromolekularen Zusammensetzung einer Mikroalgenzelle für die vollständige Stickstoffentfernung als zweiter Freiheitsgrad genutzt werden. So kann die Rückführung Biomasse mit einem hohen intrazellulären Gehalt an Stärke und/oder Lipiden die volumetrische Stickstoffaufnahme aus einem Abwasser verbessern. Die Energiespeicher können in Perioden mit geringen Lichtintensitäten (starke Bewölkung oder nachts) von den Mikroalgenzellen abgebaut werden, um die Zellteilung und die damit einhergehende Aufnahme von Stickstoff zu ermöglichen. Damit kann diese Maßnahme eine vollständige Stickstoffreduktion in einem Abwasser auch bei ungünstigen Lichtbedingungen gewährleisten. Diese Strategie bedingt allerdings das Auftreten von Phasen mit hoher Photonenverfügbarkeit, ist anhaltend wenig Licht vorhanden, kann auch eine Rückführung von Zellen keine Verbesserung der Stickstoffaufnahme ermöglichen. Jedoch kann eine Rückführung der Zellen in Phasen hoher Lichtintensität bzw. bei Lichtüberschuss bezüglich der vollständigen Nährstoffaufnahme

eine verbesserte Lichtausnutzung bewirken. Unterschreitet die Biomassekonzentration in einem Reaktor einen systemspezifischen Schwellenwert, so bleiben Photonen ungenutzt bzw. werden nicht zur Synthese von Speicherstoffen verwendet. Die Erhöhung der Biomassekonzentration kann zu einer Nährstofflimitierung führen, welche schließlich die Bildung von Speicherstoffen induziert (vgl. Abschnitte 1.3.1.2 sowie 1.3.1.5). Die für die vollständige Nährstoffaufnahme überschüssigen Photonen können so für Zeiten mit geringer Lichtintensität gespeichert und zur Verbesserung der Abwasserreinigung genutzt werden.

Basierend auf diesen Überlegungen sowie der in Kapitel 4.1 vorgestellten, experimentellen Daten wurde ein virtueller 24-stündiger kontinuierlicher Abwasseraufbereitungsprozess mit *Chlorella vulgaris* berechnet. Dabei lag der Fokus auf der Nutzung intrazellulärer Energiespeicher der Mikroalge zur Nährstoffaufnahme auch unter ungünstigen Bedingungen hinsichtlich der Lichtverfügbarkeit. Die Ergebnisse sowie deren Interpretation sind in Form eines wissenschaftlichen Papers veröffentlicht (DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.169082) welches im Literatur-Anhang in Kapitel 7.5 abgedruckt ist. Die zugrunde liegenden Formeln sind im Anhang in Kapitel 8.6.4 abgebildet. Folgend ist das virtuelle Szenario kompakt beschrieben und die wichtigsten Erkenntnisse diskutiert.

Als ökonomisches Kultivierungssystem des virtuellen Abwasseraufbereitungsszenarios wird ein offener Raceway Pond als Kultivierungssystem vorgeschlagen, an welchen eine externe Membranfiltrationseinheit (z.B. *Harvester*, vgl. Abschnitt 3.1.1) angeschlossen ist, wodurch ein Membran-Photobioreaktor entsteht. Die Lichtverteilung im Reaktor wird als ideal angenommen. Zur Darstellung der Funktionsweise wird vereinfachend ein 24-stündiger Tag in vier, jeweils sechsstündige Perioden mit konstanter Lichtintensität unterteilt: Morgen ( $I_1 = 350 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), Mittag ( $I_2 = 700 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), Abend ( $I_3 = 350 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) und Nacht ( $I_4 = 0 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Basierend auf der linearen Beziehung zwischen spezifischer Photonenabsorptionsrate und spezifischer Wachstumsrate bei vollständiger Nährstoffaufnahme im Bereich zwischen  $D = 0,3-0,6 \text{ d}^{-1}$  (siehe Abbildung 4-1), wurde eine konstante Verdünnungsrate von  $D = 0,5 \text{ d}^{-1}$  (entspricht  $\text{HRT} = 2 \text{ d}$ ) für das virtuelle Szenario gewählt. In einem realen Szenario ist eine Variation der Feststoffverweilzeit in Abhängigkeit der aktuellen und vorhergesagten Witterungsbedingungen und der Nährstoffbelastung des Abwassers denkbar. Zu Reduktion dynamischer Effekte im Modellszenario ist jedoch eine konstante Biomassekonzentration in jeder Tagesperiode vorgesehen. Die durch die externe Filtrationseinheit aufkonzentrierte Biomasse kann für eine weitere Valorisierung geerntet oder aber als Überschussbiomasse in einem externen Tank für die Nacht oder Phasen mit geringer Lichtintensität gelagert werden.

Das zu behandelnde Abwasser des virtuellen Prozesses liegt mit einer Stickstoffbelastung von  $c_{\text{NH}_4,0} = 243 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (entspricht  $c_{\text{N},0} = 189 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  bzw.  $\sim 14 \text{ mmol}_\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$ ) im Bereich der meisten kommunalen und industriellen Abwässer (Monfet und Unc 2017). Pro Tagesperiode sind  $\sim 24 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Stickstoff aus dem Abwasser zu entfernen, wodurch die Bildung von  $1676 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  aktiver Biomasse (N-Anteil: 11,94 %) möglich ist – bei ausreichender Lichtverfügbarkeit (Tabelle 5-1). Die Flexibilität des Mikroalgenstoffwechsels erlaubt die Synthese von Speicherkomponenten, wodurch die Konzentration der Biotrockenmasse diejenige der aktiven Biomasse abhängig von der Lichtintensität während der Tagesperiode übersteigt. Eine Anpassung der BTM-Konzentration durch eine Abtrennung bzw. Rückführung von Zellen mittels der externen

Filtrationseinheit kann abhängig der Anforderungen und Bedingungen des Prozesses geschehen. Eine mögliche Prozessstrategie zeigt Abbildung 5-1, welche im Folgenden näher erläutert wird.

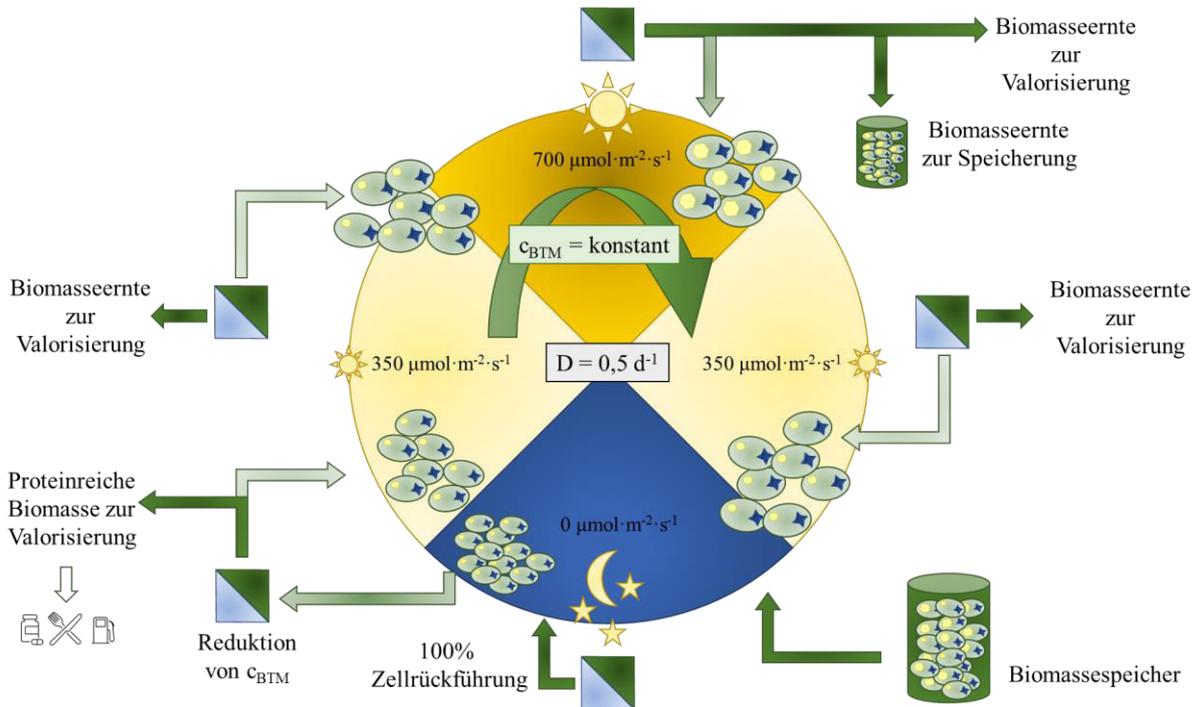


Abbildung 5-1: Virtuelles 24 h Abwasseraufbereitungsprozessschema mit der Mikroalge *Chlorella vulgaris* bei einer Verdünnungsrate von  $0,5 \text{ d}^{-1}$ . Während der Morgen- und Abend-Periode beträgt die Lichtintensität  $350 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , für die Mittags-Periode wurde diese auf  $700 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  verdoppelt. Biomasse aus den Tag-Perioden muss in einem externen Behälter gespeichert werden, um eine vollständige Nährstoffaufnahme während der Nacht zu ermöglichen. Am Ende der Nacht-Periode steht eine proteinreiche Biomasse für eine weitere Wertschöpfung zur Verfügung. Quelle: eigene Darstellung.

Während der Morgen- und Abendperiode können die Mikroalgen bei der gewählten Verdünnungsrate ( $D = 0,5 \text{ d}^{-1}$ ) nahezu den gesamten vorhandenen Stickstoff und alles an Phosphat aufnehmen. Bedingt durch die Aufnahmekinetik verbleibt eine geringe Restkonzentration beider Nährstoffe im zu behandelnden Abwasser, weshalb eine Zellrückführung in beiden Perioden nicht vorgesehen ist. In der Mittagszeit ist aufgrund der verdoppelten Lichtintensität auch die Biotrockenmasseproduktivität verzweifacht. Die aktive Biomasse bleibt wie beschrieben allerdings konstant, es entsteht stärkereiche Biomasse, welche abgeschöpft werden kann. Im simulierten Beispiel wird die Konzentration der Gesamtbiomasse der Übersichtlichkeit halber konstant gehalten, was aber in der Praxis nicht zwingend erforderlich ist. Tabelle 5-1 fasst die theoretisch erzielbaren Biomassekonzentrationen (Biotrockenmasse sowie aktive Biomasse) sowie die daraus resultierende Stickstoffkonzentration im Reaktor während der einzelnen Perioden des 24 h Tages zusammen. Lediglich für die Mittag-Periode ( $I_2$ ) ist eine Reduktion der BTM-Konzentration vorgesehen, um stärkereiche Biomasse abzuschöpfen und für eine Rückführung während der Nacht zu speichern. Für alle Tageslichtperioden ( $I_1$ - $I_3$ ) ist eine vollständige Nährstoffaufnahme ohne Zellrückführung unter den gegebenen Bedingungen möglich.

Basierend auf den Daten aus Kapitel 4.1.1 konnte eine spezifische Ammonium-Aufnahmerate während der Nacht von  $6,25 \text{ mg}_{\text{NH}_4} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  berechnet werden. Dieser Wert liegt oberhalb der für die Dunkelperiode benötigten Rate von  $5,06 \text{ mg}_{\text{NH}_4} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Mikroalgen sind also in der Lage, Stickstoff hinreichend schnell im Verlauf der 6-stündigen Nachtphase aufzunehmen. Zudem wurde eine spezifische Ausbeute der  $\text{NH}_4^+$ -Aufnahme auf Kosten des intrazellulären Stärkegehaltes von  $0,19 \text{ mg}_{\text{NH}_4} \cdot \text{mg}_{\text{Stärke}}^{-1}$  ermittelt. Für das vorliegende virtuelle Szenario bedeutet dies eine minimale Biotrockenmassekonzentration während der Nachtperiode von  $\sim 1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , wobei die Biomasse einen Kohlehydratgehalt von mindestens 27 % aufweisen muss. Dies kann durch Speicherung von Biomasse während der Tageslichtperioden erreicht werden (vgl. Tabelle 5-1). Am Ende der Nacht steht eine proteinreiche Mikroalgenbiomasse zur weiteren Valorisierung zur Verfügung.

Tabelle 5-1: Biomassekonzentrationen (BTM und ABM) und resultierende Stickstoffkonzentration im Reaktor des virtuellen Abwasseraufbereitungsprozesses der verschiedenen Tageslichtperioden des 24 h Tages. Lediglich für die Mittag-Periode ( $I_2$ ) wird die theoretisch erzielbare Biomassekonzentration ( $c_{\text{BTM,th}}$ ) reduziert, um stärkereiche Zellen für eine Rückführung während der Nacht-Periode ( $I_4$ ) zu speichern.

	$I_1$	$I_2$	$I_3$
$c_{\text{BTM,th}}$ in $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	2,37	4,74	2,37
$c_{\text{ABM,th}}$ in $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	1,61	1,67	1,61
$c_{\text{BTM,PBR}}$ in $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	2,37	2,37	2,37
$c_{\text{ABM,PBR}}$ in $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	1,61	0,757	1,61
$q_{\text{Kohlehydrat,BTM}}$ in %	30,2	62,5	30,2
$c_{\text{N,residual}}$ in $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	0,0079	0,00	0,0079

Die virtuelle Abwasseraufbereitungsstrategie wurde zudem für reduzierte Lichtintensitäten der Tageslichtperioden ((i) 80 % und (ii) 50 %) evaluiert. Szenario (i) repräsentiert dabei einen bewölkten Tag, wobei eine Erhöhung der SRT um 20 % weiterhin eine vollständige Nährstoffaufnahme ermöglicht. Bei einer Reduktion der Lichtverfügbarkeit um 50 % (Szenario (ii)) hingegen führt selbst eine Erhöhung der SRT um 50 % zu keiner Eliminierung aller vorhandenen Nährstoffe. Durch die Rückführung von Zellen sinkt die spezifische Photonenerverfügbarkeit, wodurch weniger intrazelluläre Energiespeicher gebildet werden können. Diese sind allerdings Voraussetzung für einen Einbau von Nährstoffen in die aktiv metabolisierende Zelle bei ungünstigen Lichtverhältnissen. Trotz des erheblichen Potentials von MPBR-Systemen zur Optimierung der mikroalgenbasierten Abwasseraufbereitung bleibt die Licht- bzw. Energieversorgung der Mikroalgenzellen weiterhin größte Herausforderung, welche auch durch ein Rückführen der Zellen nicht gelöst werden kann. Dennoch ist die Zellrückführung ein sehr nützliches Instrument, um die vollständige Nutzung aller verfügbaren Photonen sicherzustellen und auftretende Schwankungen der Lichtintensität oder Nährstoffkonzentration auszugleichen.

Das entworfene Szenario zeigt auch die Grenzen der mikroalgenbasierten Abwasseraufbereitung auf. Stoffe bzw. Moleküle können aus einem System erfolgreich durch deren Abbau eliminiert werden – die Elemente dahingegen nicht. Gegenüber allen anderen Elementen hat Kohlenstoff eine Art Sonderstellung, da es – zumeist als Organik im Kulturmedium gelöst – den zersetzenden Mikroorganismen als Energiequelle dient und zudem durch den mikrobiellen Abbau in Form von  $\text{CO}_2$  in die Atmosphäre entweicht. Eine hohe Beladung eines Abwassers

mit organischen C-Quellen kann dementsprechend durch eine Erhöhung der Zellzahl ausgeglichen werden. Stickstoff- bzw. phosphorhaltige Komponenten in Abwässern hingegen dienen photoautotrophen Organismen nicht als Energiequelle, weshalb eine Differenzierung in der Prozessführung zwischen zu eliminierender Komponente und Energiequelle notwendig wird.

## 5.2 Einsatz eines AMPBR zur optimierten Nährstoffaufnahme aus Abwasser durch Mikroalgen

### 5.2.1 Zellrückführung im Labormaßstab

Die in Kapitel 3.1.2 beschriebene Membranfiltrationsanlage *Mini-Harvester* wurde so konzipiert, dass diese an das am Institut vorhandene Photobioreaktorsystem im Labormaßstab (vgl. Kapitel 2.5) gekoppelt werden kann. Der Aufbau aus Photobioreaktor und *Mini-Harvester* resultierte damit in einem Membran-Photobioreaktor mit externer Membraneinheit (vgl. Abschnitte 1.3.3.2 und 2.5.4), welcher für kontinuierliche Kultivierungsexperimente mit Zellrückführung eingesetzt wurde. Für den Betrieb des MPBR wurde das Prozessleitsystem BioProCon (vgl. Abschnitt 3.1.2.4) eingesetzt, um die verschiedenen Funktionen der Anlage ausführen zu können. Verschiedene Abläufe, wie die Erzeugung eines konstanten Filtrat-Fluxes am *Mini-Harvester*, wurden in der Automatisierung mittels PI-Regler<sup>1</sup> realisiert. Die benötigten Regelparаметer konnten erfolgreich eingestellt werden (vgl. Abschnitt 8.3.4), sodass eine Inbetriebnahme des MPBR möglich war. In einem kritischen Flux Experiment (Flux-Step-Methode, Schritthöhe:  $2 \text{ L} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ , Rückspülen zwischen den Flux-Schritten, Kriterium für  $J_c$ :  $10 \text{ Pa} \cdot \text{min}^{-1}$ , vgl. Abschnitt 2.7.3) mit *Chlorella vulgaris* Suspensionen (A:  $1,5 \text{ g}_{\text{BTM}} \cdot \text{L}^{-1}$ , B:  $3,0 \text{ g}_{\text{BTM}} \cdot \text{L}^{-1}$ ) wurden kritische Flux Werte von  $17 \text{ L} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$  (B) und  $20 \text{ L} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$  (A) bestimmt (vgl. Abschnitt 8.4.2.4). Damit konnten die Grenzen des Arbeitsbereiches während einer kontinuierlichen Kultivierung mit Zellrückführung festgelegt werden. Nach der erfolgreichen Inbetriebnahme des MPBR-Systems wurden in drei Versuchsreihen Kultivierungsexperimente mit der Mikroalge *Chlorella vulgaris* SAG 211-12 in mBG11-Medium als synthetisches Abwasser (siehe Kapitel 2.2) mit Zellrückführung durchgeführt, welche im Folgenden beschrieben sind. Die Kultivierungsparameter jedes Ansatzes sind in Tabelle 2-3 zusammengefasst.

Im Zuge der ersten Versuchsreihe mit dem MPBR-System wurde *C. vulgaris* bei permanenter Beleuchtung kontinuierlich kultiviert. Dabei wurden die Verdünnungsraten  $D = 0,4 \text{ d}^{-1}$  und  $D = 0,5 \text{ d}^{-1}$  angewandt und Zellen aus dem Retentat zurück in den PBR geführt ( $v_{0,4} = 1,20$ ,  $v_{0,5} = 1,04$ ). Die Kultivierung mit Zellrückführung erzielte eine höhere Biomasseproduktivität ( $Pe_{0,4} = 1,36 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,  $Pe_{0,5} = 1,25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) im Vergleich zum klassischen PBR-Betrieb (vgl. Abschnitt 8.5.1 und 8.5.3) bei weiterhin vollständiger Stickstoffaufnahme. Trotz der geringeren Lichtverfügbarkeit pro Zelle bei einer Zellrückführung waren die Mikroalgen in der Lage, den

---

<sup>1</sup> In der einschlägigen Literatur wird die Abkürzung PI-Regler für einen Proportional-Integral-Regler verwendet. Mit Ausnahme der Nennung des PI-Reglers an dieser Stelle ist P im gesamten Text der vorliegenden Arbeit allerdings als Abkürzung für Phosphor festgelegt.

vorhandenen Stickstoff vollständig aufzunehmen. Die Biomasse im vorliegenden Experiment war charakterisiert durch einen geringen Kohlehydrat- (20-21 %<sub>BTM</sub>) und moderaten Pigmentgehalt (5-6 %<sub>BTM</sub>). Dies deutet auf eine Lichtlimitierung der Mikroalgenzellen hin, die vorhandene Photonenmenge erlaubte keine Akkumulation intrazellulärer Speicherkomponenten (Stärke). Da aufgrund mangelnder Probenmenge keine Quantifizierung des Proteingehaltes erfolgte, ist keine detailliertere Analyse des Stoffwechsels möglich.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde der Einfluss der Zellrückführung bei einer kontinuierlichen Kultivierung bei  $D = 1,0 \text{ d}^{-1}$  mit einem Hell/Dunkel-Regime von 16 h:8 h untersucht. In zwei Ansätzen wurden verschiedene Zellrückföhrtraten während der Hell- und Dunkelphasen getestet: (A)  $D_{\text{Hell}} = D_{\text{Dunkel}} = 1,0 \text{ d}^{-1}$ ,  $v_{\text{Hell}} = 0$ ,  $v_{\text{Dunkel}} = 3$  und (B)  $D_{\text{Hell}} = D_{\text{Dunkel}} = 1,0 \text{ d}^{-1}$ ,  $v_{\text{Hell}} = v_{\text{Dunkel}} = 3$ . Die Beprobung des MPBR fand jeweils am Ende der Hellphase ( $t_0 = -0,5 \text{ h}$ ) und zu zwei Zeitpunkten während der Dunkelphase ( $t_1 = 3,5 \text{ h}$  und  $t_2 = 7,5 \text{ h}$ ) statt. In beiden Ansätzen konnte das Rückföhren von Zellen in der Dunkelphase ein Auswaschen der Biomasse verhindern (vgl. Abbildung 5-2 A). Allerdings war keine vollständige Nährstoffaufnahme (Stickstoff und Phosphor) trotz Zellrückföhung möglich (vgl. Abbildung 5-2 C). Bei einer Rückföhung am Tag und in der Nacht war aufgrund der erhöhten Biomassekonzentration in Ansatz (B) (vgl. Abbildung 5-2 B) eine verbesserte Stickstoffaufnahme im Laufe von 24 h im Vergleich zu einem Zellrecycling nur am Tag messbar (vgl. Abbildung 5-2 C). Zum Probenahmezeitpunkt am Ende der Hellphase konnte die N-Aufnahme bei Ansatz A zu 56 %, bei Ansatz B zu 63 %, die P-Aufnahme bei Ansatz A zu 55 % und bei Ansatz B zu 69 % quantifiziert werden. Die Rückföhung von Zellen während der Hell- und Dunkelphase (Ansatz B) erlaubte also eine verbesserte Nährstoffaufnahme durch die Mikroalgenzellen im Vergleich zu Ansatz A. Ohne Zellrückföhung (siehe Abschnitt 4.1) war bei gleicher Verdünnungsrate eine Stickstoffaufnahme am Tag (16 h) von 58 % messbar. Bei der kontinuierlichen Kultivierung ohne Zellrückföhung wurde lediglich während der Hellphase Medium zugeföhrt, wodurch die Gesamtbeladung der Zellen mit Stickstoff geringer ausfällt. Die Ergebnisse zeigen damit eine verbesserte Stickstoffaufnahme durch die Mikroalge *Chlorella vulgaris* aus dem Medium bei Einsatz der Zellrückföhung. In beiden Ansätzen konnten die Mikroalgenzellen lediglich geringe Kohlehydratspeicher von 14 %<sub>BTM</sub> bzw. 15 %<sub>BTM</sub> generieren (Abbildung 5-2 B), welche im Laufe der Dunkelphase abgebaut wurden (Reduktion um 28,6 % (A) bzw. 13,3 % (B)). Lediglich in Ansatz B ging dies mit einem Abbau der Lipidfraktion um 5,0 % sowie einer Zunahme des Proteingehaltes um 6,8 % einher. Aufgrund technischer Schwierigkeiten sind die gezeigten Ergebnisse lediglich ein erster Anhaltspunkt, welche die Planung weiterer Experimente unterstützt. Nichtsdestoweniger zeigen sie das Potential und die Eignung eines MPBR-Systems zur kontinuierlichen Mikroalgenkultivierung bei gleichzeitiger Abwasseraufbereitung.

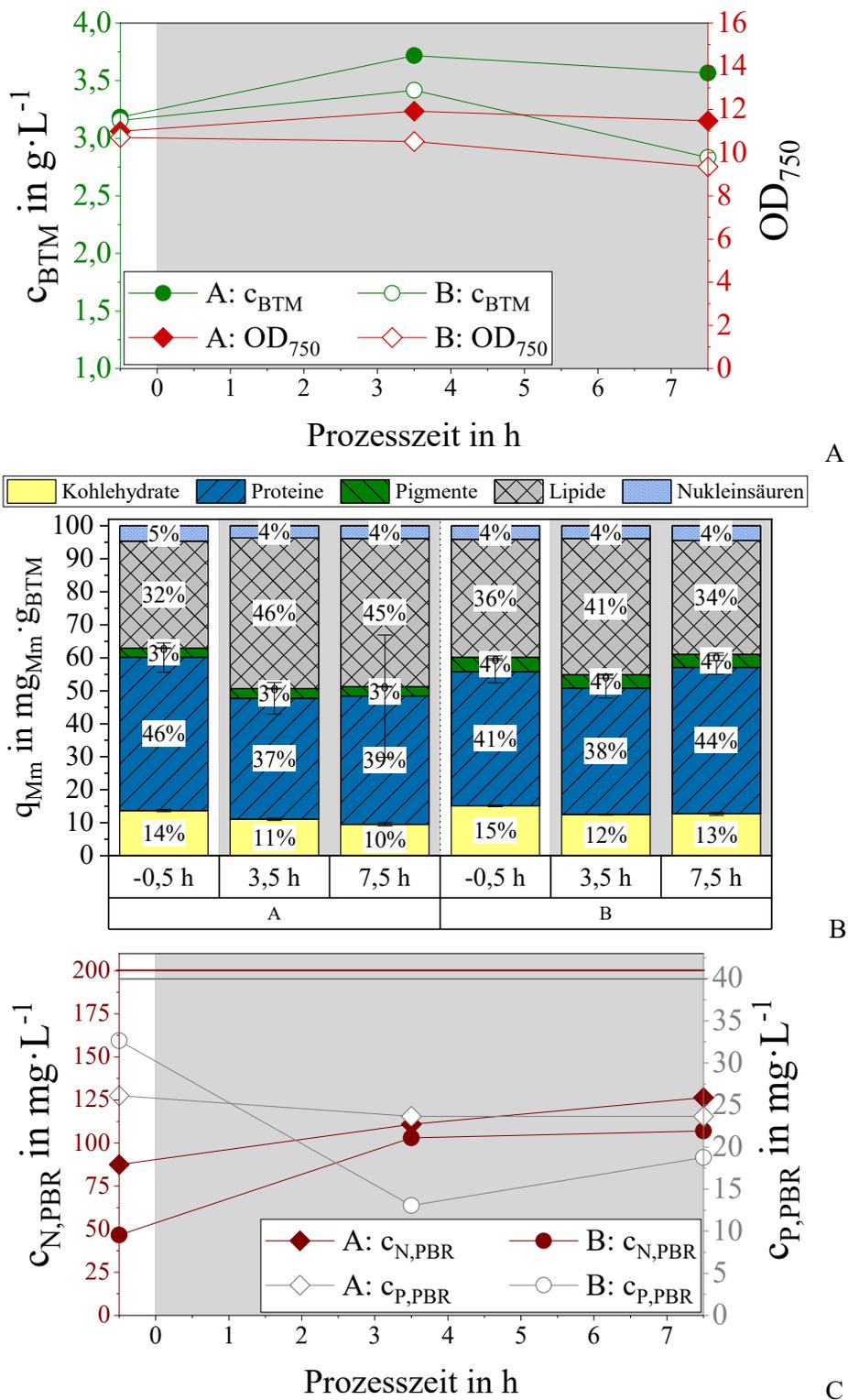


Abbildung 5-2: Biomassequantifizierung (A), makromolekulare Zusammensetzung (B) und Nährstoffkonzentrationen im PBR (C) einer kontinuierlichen Kultivierung ( $D = 1,0 \text{ d}^{-1}$ ) von *C. vulgaris* SAG 211-12 mit Zellrückführung bei einem Hell/Dunkel-Regime von 16 h:8 h. Ansatz A: Gleichbleibende Verdünnungsrate während der Hell- und Dunkelphase, Zellrückführung mit  $v = 3$  nur während der Nacht. Ansatz B: Gleichbleibende Verdünnungsrate und Rückführverhältnis von  $v = 3$  während der Hell- und Dunkelphase. Die Linien in (C) markieren die Nährstoffkonzentrationen (Sollwerte) im Medium.

Eine dritte Versuchsreihe startete zunächst mit einer Satzkultivierung von *C. vulgaris* bei permanenter Beleuchtung. Nach Erreichen der stationären Wachstumsphase (evaluiert am Verlauf der Biotrockenmassekonzentration, siehe Abbildung 8-18), wurde die Kultivierung für weitere drei Tage fortgeführt, um eine Stickstofflimitierung der Mikroalgenzellen zu induzieren. Der anhaltende Nährstoffmangel führte zu einer Verringerung der intrazellulären Gehalte der Kohlehydrate (10,46 %<sub>BTM</sub>), Proteine (13,0 %<sub>BTM</sub>) und Pigmente (0,56 %<sub>BTM</sub>) der Biotrockenmasse, sowie eines starken Anstiegs des berechneten Lipidgehaltes auf 74,68 %<sub>BTM</sub> ( $q_{\text{Nukleinsäuren, BTM}} = 1,30$  %). In dieser Kultivierungsphase wurde dem Photobioreaktor Stickstoff injiziert ( $c_{\text{N, PBR, gemessen}} = 84,90 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), wobei eine mehrfache Beprobung des Reaktorinhaltes in einem Zeitintervall von 8 h nach der Stickstoffzugabe stattfand. Die Aufnahme von Stickstoff durch die Mikroalgenzellen war nachweisbar, 43 % des injizierten Stickstoffs wurden innerhalb von 8 h aus dem Medium entfernt (siehe Abbildung 8-19). Allerdings war lediglich eine geringfügige Zunahme des intrazellulären Proteingehaltes auf 15,2 %<sub>BTM</sub> bzw. eine leichte Abnahme der Kohlehydrat- und Lipidgehalte auf 9,0 %<sub>BTM</sub> bzw. 73,5 %<sub>BTM</sub> messbar (vgl. Abbildung 8-19). Der Anstieg des Pigmentgehaltes um 28 % (vgl. Abbildung 8-19) indiziert den Einsatz des von den Mikroalgenzellen aufgenommene Stickstoff zur Pigmentsynthese. Nach Abschluss der Beprobung wurde die kontinuierliche Kultivierung mit  $D = 0,3 \text{ d}^{-1}$  gestartet und der Reaktor nach Erreichen eines Fließgleichgewichts beprobt ( $t = -1 \text{ h}$  in Abbildung 5-3). Im Anschluss an die Beprobung des kontinuierlichen Betriebs wurde bei gleichbleibender Verdünnungsrate eine Dunkelphase einer Dauer von 8 h gestartet und gleichzeitig die Rückführung von Zellen in den PBR ( $v = 1$ ) durch Ankopplung des *Mini-Harvesters* initiiert. Die achtstündige Dunkelphase wurde zu drei Zeitpunkten ( $t_1 = 0 \text{ h}$ ,  $t_2 = 4 \text{ h}$ ,  $t_3 = 8 \text{ h}$ ) beprobt (Abbildung 5-3). Aufgrund der Konstruktion des MPBR-Systems konnten lediglich geringe Probenmengen entnommen werden, da ansonsten ein Absinken des Füllstandes im *Mini-Harvester* zu einer Störung des laufenden Betriebs geführt hätte. Daher wurde der Umfang der Analytik reduziert.

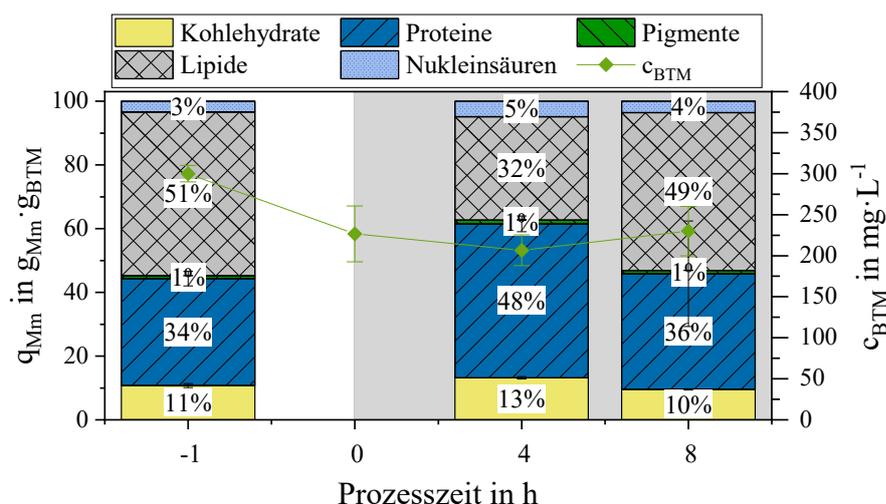


Abbildung 5-3: Makromolekulare Zusammensetzung und Biotrockenmassekonzentration einer kontinuierlichen Kultivierung ( $D = 0,3 \text{ d}^{-1}$ ) von *C. vulgaris* SAG 211-12 mit Zellrückführung ( $v = 1$ ) bei einem Hell/Dunkel-Regime von 16 h:8 h.

Abbildung 5-3 zeigt eine Abnahme der Biotrockenmassekonzentration nach Abschalten der Beleuchtung ( $t = -1$  h bis  $t = 0$  h), welche im Verlauf der Dunkelphase (ab  $t = 0$  h bis  $t = 8$  h) konstant bleibt. Die Zellrückführung konnte also ein Auswaschen der Zellen erfolgreich verhindern. Die Unterschiede in der makromolekularen Zusammensetzung (vor allem Kohlehydrat-, Protein- und Lipidgehalt) zwischen der Probe der Hellphase ( $t = -1$  h) und Dunkelphase ( $t = 4$  h) sind vermutlich auf ein Nicht-Erreichen des Fließgleichgewichts zurückzuführen. Bei einer Verdünnungsrate von  $D = 0,3 \text{ d}^{-1}$  tritt aufgrund der geringen Beladung des PBR mit Stickstoff eine Limitierung dieses Nährstoffes für die Zellen auf (siehe Kapitel 4.1). Eine Zunahme des Proteingehaltes in Abwesenheit von Licht ohne Zugabe von Stickstoff ist daher unwahrscheinlich. Bei Abwesenheit von Licht lässt die Reduktion des intrazellulären Kohlehydratgehaltes zu Gunsten des Lipidgehaltes vermuten, dass der Kurzzeitenergiespeicher Stärke in Abwesenheit von Licht in den Langzeitenergiespeicher Lipide umgewandelt wurde. Die Abnahme des Proteingehaltes während der Dunkelphase unterstreicht die angenommene Stickstofflimitierung. Da aufgrund von Geräteausfällen ab der kontinuierlichen Phase eine prozessbegleitende Analyse der Nährstoffkonzentrationen im Reaktorausfluss ausblieb, ist keine Aussage bzw. kein Vergleich über die Nährstoffaufnahme der Mikroalgenzellen mit und ohne Zellrückführung möglich.

Nach der erfolgreichen Inbetriebnahme und den ersten Versuchen war eine weitere Versuchreihe zur Ausarbeitung und Demonstration der in Abschnitt 5.1 vorgestellten Strategie einer kontinuierlichen Abwasseraufbereitung mit Hell/Dunkel-Regime im 24 h Betrieb angedacht. Aufgrund langer Ausfallzeiten der praktischen Laborarbeit durch Infektionsschutzmaßnahmen im Zuge der COVID-19-Pandemie konnten diese allerdings nicht mehr realisiert werden. Das Versuchskonzept ist daher in den Ausblick (Kapitel 6) integriert.

### 5.2.2 Zellrückführung im Pilotmaßstab

Die Konzeption der in Kapitel 3.1.1 beschriebenen Membranfiltrationsanlage *Harvester* erlaubte deren flexiblen Einsatz an verschiedenen Einsatzorten. So wurde die Anlage für gemeinsame Experimente mit Projektpartnern der School of Science der Constructor University Bremen eingesetzt. Der *Harvester* wurde hierfür nach Bremen transportiert und erfolgreich an die dortige Photobioreaktortechnologie (fünf Polyethylen Phytobags zu je 200 L, 5 m Länge, 1,5 m Höhe, vgl. Wang et al. 2018) angeschlossen. Der so entstandene MPBR konnte erfolgreich für kontinuierliche Kultivierungsexperimente mit Zellrückführung eingesetzt werden. Die Ergebnisse der Versuche wurden in Form eines wissenschaftlichen Papers (DOI: 10.1016/j.biortech.2023.129986) veröffentlicht welches im Literatur-Anhang in Kapitel 7.4 abgedruckt ist.



Abbildung 5-4: Kontinuierliche Kultivierung von *Desmodesmus* sp. in einem synthetischen Abwasser in miteinander verbundenen „Beutel“-Photobioreaktoren (Phytobags) (A) mit externer Membraneinheit (*Harvester*) (B) zur Realisierung eines MPBR. Durch die Kopplung von fünf Phytobags wurde ein Reaktorvolumen von 1000 L realisiert. Entlang des Reaktorbodens ermöglicht ein poröses Rohr die Begasung des Reaktorinhaltes zur Durchmischung sowie zum Gasaustausch. Die Beleuchtung des PBR-Systems erfolgt über natürliches Sonnenlicht, Schattenbereiche wurden mit künstlicher Beleuchtung behoben. Ein an das Prozessleitsystem des *Harvesters* angeschlossener Trübungssensor erlaubt die prozessbegleitende Quantifizierung der Biomassekonzentration im PBR. Quelle: Aufnahmen von Rohit Dey.

Ziel der Versuchsreihe war die Etablierung eines Systems zur mikroalgenbasierten Aufbereitung eines synthetischen Abwassers mittels eines MPBR-Systems im Pilotmaßstab im Laufe eines Jahres unter Umweltbedingungen. Einsatz hierfür fand die Mikroalge der Spezies *Desmodesmus* sp., welche aus einer Kläranlage in Deutschland isoliert wurde (Han et al. 2020). Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche (vgl. Tabelle 5-2) zeigten, dass die verwendete Mikroalge nicht zur Aufnahme und Speicherung von für das Wachstum überschüssigem Phosphor (*luxury uptake*) ist. Dieser Aspekt wird bislang in der Literatur wenig diskutiert und muss bei der Konzeption einer mikroalgenbasierten Abwasseraufbereitungsstrategie berücksichtigt werden.

Zunächst fand eine kontinuierliche Kultivierung der Mikroalge im synthetischen Abwasser im Sommer ( $D = 0,3 \text{ d}^{-1}$ ,  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) und Winter ( $D = 0,2 \text{ d}^{-1}$ ,  $95 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) ohne Zellrückführung statt. Dabei wurden Biotrockenmassekonzentrationen von  $0,8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  (Sommer) bzw.  $0,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  (Winter) im PBR erreicht, welche durch das Prozessleitsystem des *Harvesters* (BioProCon, siehe Abschnitt 3.1.1.3) konstant gehalten wurden. Immer Sommer war aufgrund der höheren Lichtverfügbarkeit eine verbesserte Aufnahme von Stickstoff und Phosphor nachweisbar (vgl. Tabelle 5-2).

Im Anschluss wurde der *Harvester* an das PBR-System gekoppelt und der Betrieb des MPBR gestartet. Die kontinuierliche Kultivierung mit Zellrückführung (Sommer:  $D = 0,3 \text{ d}^{-1}$ ,  $\nu = 1$ ,  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , Winter:  $D = 0,2 \text{ d}^{-1}$ ,  $\nu = 1$ ,  $95 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) führte zu einem Anstieg der Biomassekonzentration im PBR bis zu einem Schwellenwert nach 4 Tagen. Im Sommer kam das Mikroalgenwachstum aufgrund von Nährstofflimitierungen zum Erliegen, Stickstoff und Phosphor wurden vollständig aus dem synthetischen Abwasser entfernt. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Erhöhung der Durchflussrate im Sommer möglich ist, wodurch das Wachstum der Mikroalgen positiv beeinflusst würde, sodass neben einer höheren Rate an aufgereinigtem

Abwasser auch eine höhere Biomasseproduktivität zu erwarten sind. Im Winter konnte aufgrund einer Lichtlimitierung keine vollständige Nährstoffaufnahme erreicht werden, der Mangel an Photonen reduzierte zudem die Neubildung von Biomasse. Möglicherweise kann durch eine Reduktion der Biomassekonzentration im Reaktor und die damit einhergehende höhere spezifische Photonenverfügbarkeit eine bessere Nährstoffaufnahme erreicht werden.

Im darauffolgenden „Real-Life“-Experiment wurde das MPBR-System für jeweils 30 Tage in Sommer und Winter zur Aufreinigung des synthetischen Abwassers eingesetzt. Abhängig der gemessenen Lichtintensitäten an Photobioreaktoroberfläche wurde der Betrieb in drei Szenarien eingeteilt: (i) Bei Lichtintensitäten  $> 200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  werden die Mikroalgenzellen mit  $v = 1$  in den Photobioreaktor zurückgeführt und gleichzeitig die Verdünnungsrate so lange erhöht, bis die Grenzwerte der Einleitung in natürliche Gewässer in Deutschland erreicht wurden (externe Messung der Nährstoffkonzentration des Filtrats). (ii) Bei Lichtintensitäten zwischen  $100\text{--}200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  wurde eine konstante Verdünnungsrate von  $D = 0,3 \text{ d}^{-1}$  angewandt und zudem eine konstante Soll-Biomassekonzentration von  $0,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  im PBR eingestellt. (iii) Bei Lichtintensitäten  $< 100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  wurden die Verdünnungsrate sowie die Soll-Biomassekonzentration im PBR auf  $0,2 \text{ d}^{-1}$  bzw.  $0,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  reduziert. Im Sommer dominierte Szenario (i), wobei die Biomassekonzentration bei starker Bewölkung herabgesetzt wurde, um weiterhin eine vollständige Nährstoffaufnahme zu gewährleisten. Während des 30 Tage Betriebs konnten 8700 L synthetisches Abwasser gereinigt und dadurch 13 kg Biotrockenmasse erzeugt werden. Im Winter traten hauptsächlich die Szenarien (ii) und (iii) auf, sodass der Reaktor mit geringen Biomassekonzentrationen betrieben wurde. Die Anpassung der Biomassekonzentration in Abhängigkeit der Lichtverfügbarkeit ermöglichte eine vollständige Nährstoffaufnahme aus dem synthetischen Abwasser. Insgesamt konnten im Winter-Experiment (30 Tage) 7400 L Abwasser aufgereinigt und dabei 3,964 kg Biomasse erzeugt werden.

Tabelle 5-2: Effizienz des PBR- und MPBR-Systems während jedes Ansatzes im Sommer (So) und Winter (Wi). Verglichen wurden die Nährstoffaufnahmeleistungen (N, P), Biomasseproduktivität und Abwasseraufbereitungskapazität für verschiedene Ansätze. S1: kontinuierliche Kultivierung ohne Zellrückführung, S2: kontinuierliche Kultivierung mit Zellrückführung und „Real-Life“: kontinuierliche Kultivierung mit Zellrückführung und Anpassung der Biomassekonzentration abhängig der Lichtintensität.

	Satzphase		S1		S2		„Real-Life“	
	So	Wi	So	Wi	So	Wi	So	Wi
<i>N-Aufnahmerate in <math>\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}</math></i>	12,33	7,00	45,00	30,00	45,00	30,00	43,50	37,00
<i>P-Aufnahmerate in <math>\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}</math></i>	1,040	0,535	3,000	2,000	3,000	2,000	2,900	2,470
<i>Biomasseproduktivität in <math>\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}</math></i>	0,070	0,017	0,240	0,120	0,370	0,210	0,433	0,132
<i>Kapazität der Abwasseraufbereitung in <math>\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}</math></i>	91,0	38,5	300,0	200,0	300,0	200,0	290,0	247,0

Tabelle 5-2 zeigt die verbesserte Biomasseproduktivität von 80 % im Sommer und 10 % im Winter bei Einsatz der Zellrückführung (S1), verglichen mit einer kontinuierlichen Kultivierung ohne Rückführung von Biomasse (S2). Die Aufnahmeraten der Nährstoffe Stickstoff und Phosphor im Winter konnten durch eine Anpassung der Biomassekonzentration im PBR im „Real-Life“-Ansatz um 23 % gesteigert werden, im Vergleich zur klassischen kontinuierlichen Kultivierung. Eine Elementaranalyse der Mikroalgenbiomasse ergab eine Wiederfindung der im Medium eingesetzten Nährstoffe (N und P) von 87-96 % (N) bzw. 94-96 % (P) für alle getesteten Ansätze. Während des „Real-Life“-Ansatzes lagen die Nährstoffgehalte Jahreszeitenunabhängig jeweils unterhalb der Grenzwerte für eine Einleitung des MPBR-Effluents in natürliche Gewässer für Deutschland. Die Ergebnisse demonstrieren damit das Potential eines MPBR-Systems zur effizienten mikroalgenbasierten Abwasseraufbereitung. Das System erlaubt zudem, auf Schwankungen der Umweltbedingungen einzugehen, um Wasser einer gleichbleibenden Qualität zu generieren.



## 6 Fazit und Ausblick

Im Zuge der vorliegenden Arbeit konnte eine Prozessstrategie zur kontinuierlichen Abwasseraufbereitung mittels Mikroalgen erfolgreich ausgearbeitet werden. Basis hierfür waren kontinuierliche Kultivierungsversuche mit der Mikroalge *Chlorella vulgaris* bei einem Hell/Dunkel-Regime von 16 h:8 h in einem synthetischen Abwasser als Kulturmedium sowie die Entwicklung einer geeigneten Abtrenneinheit (Membranfiltrationsanlage). Die experimentellen Daten zeigten eine Adaption der makromolekularen Zusammensetzung der Mikroalgenzellen an die verschiedenen Limitierungszustände (Nährstoffe, Licht), die während der Kultivierung auftraten. Die Daten wurden im Anschluss zur Erweiterung eines vereinfachten Modells des Mikroalgenstoffwechsels eingesetzt und erlaubten die Berechnung des virtuellen Abwasseraufbereitungsprozesses. Als Freiheitsgrade des Prozesses wurden die Rückführung von Zellen sowie die Flexibilität der makromolekularen Zusammensetzung einer Mikroalgenzelle berücksichtigt. Beide Werkzeuge erlauben eine vollständige Nährstoffaufnahme durch die Mikroalgen aus dem Abwasser im Verlauf von 24 h auch bei ungünstigen Lichtbedingungen. Die Prozessstrategie stellt somit einen Anfang für eine Optimierung der mikroalgenbasierten Abwasseraufbereitung dar.

Das für die Prozessstrategie zugrunde liegende Modell des Mikroalgenstoffwechsels (basierend auf Blanken et al. 2016) kann künftig durch verschiedene Aspekte erweitert und im Anschluss in einer Simulation verbildlicht werden. Eine mögliche Erweiterung ist dabei die Synthese von Lipiden als Langzeitenergiespeicher (Zhu et al. 2014) sowie deren Abbau in Abwesenheit von Licht, welche im momentanen Modell nicht mit berücksichtigt sind. Da die Bildung von Speicherkohlehydraten und -lipiden aus gemeinsamen, aus der Photosynthese stammenden Vorstufen geschieht, ist vor allem die Verteilung dieser Kohlenstoffgerüste in den jeweiligen Syntheseweg ein zentraler Aspekt. Die Aufteilung ist speziesspezifisch und ein komplexer Prozess, welcher auf Genomebene reguliert wird (Breuer et al. 2014). In erster Näherung für *Chlorella* könnte die Lipidsynthese als prozentualer Anteil der Stärkebildung angenommen werden.

Die Differenzierung des Einbaus von Stickstoff und Phosphor in die funktionellen Makromoleküle der Zelle, hauptsächlich Proteine, Nukleinsäuren und Pigmente, ist ein weiterer potenzieller Erweiterungspunkt. Das aktuelle Modell umfasst den gesamten Biomasseaufbau als einzelnen Anabolismus-Knoten, in welchem keine Aufspaltung stattfindet. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen zwar einen konstanten Proteingehalt der aktiven Mikroalgenzelle, der Pigmentgehalt schwankt allerdings abhängig der Lichtverfügbarkeit. Mit einem N-Anteil von ~8 % in Chlorophyll a, dem Carotinoid mit dem höchsten Anteil an den Pigmenten (Safi et al. 2014), kann der Stickstoffbedarf einer Mikroalgenzelle und damit dessen Aufnahme gerade bei hohen Pigmentgehalten schwanken. Zudem kommt es zu einer Veränderung des Absorptionsquerschnitts, wodurch die Photonenaufnahme und somit auch der Lichtgradient beeinflusst sind. Durch eine Aufteilung des intrazellulären Stickstoffstromes im Anabolismus könnten solche Schwankungen abgebildet und die Rückkopplung mit der verfügbaren Photonenmenge berücksichtigt werden. Der Anteil an Stickstoff bzw. Phosphor in Nukleinsäuren beträgt 16 % bzw. 9 % (Geider und La Roche 2002). Damit stellt die Bildung von DNA und RNA die Hauptphos-

phorsenke in einer Algenzelle dar, wobei die RNA-Menge die der DNA um ein Vielfaches übersteigt. Zudem steigt der Gehalt beider Nukleinsäuren mit zunehmender Wachstumsrate an. (Carr und Mann 1975) Entsprechend ist auch die Synthese von Nukleinsäuren ein Faktor, der die Nährstoffaufnahme und -verarbeitung in der Zelle wesentlich beeinflussen kann. Momentan folgt die Nährstoffaufnahme im Stoffwechselmodell einer Michaelis-Menten Kinetik. Stickstoff ist im Gegensatz zu Phosphor nicht in Form von Granula speicherbar, sondern bedingt den Einbau in ein aus der Photosynthese stammendes Kohlenstoffgerüst, weshalb die Stickstoffaufnahme an den Anabolismus gekoppelt ist. (Franks et al. 2022) Auf diesem Wissen basierend könnten in Abgleich mit der Literatur andere Mechanismen zur Beschreibung der Aufnahme von Stickstoff etabliert werden.

Im Anschluss an die Erweiterung des Stoffwechselmodelles kann dessen Simulation wertvolle Erkenntnisse und Zusammenhänge liefern, die Basis simulationsgestützter Versuche sein können. Die Simulation sollte neben dem Mikroalgenstoffwechsel zudem Modelle der in einen Photobioreaktor eintreffende Lichtintensität in Abhängigkeit verschiedener Umweltbedingungen (Bewölkung, Lichtstunden, etc.) sowie die Lichtverteilung im Reaktor unter Berücksichtigung der Zellkonzentration sowie deren Pigmentgehalt berücksichtigen. Weiterhin sollte die Modellierung der Zellrückführung, mit der im Zuge der vorliegenden Arbeit entwickelten Filtrationsanlage *Harvester* miteinbezogen werden. Die Machbarkeit der kontinuierlichen Abwasseraufbereitung im 24 h Betrieb mittels Mikroalgen kann anhand der Simulation für verschiedene klimatische Bedingungen gezeigt werden und zudem die Grenzen des Systems darstellen. Auch können Biomassekonzentrationen zur optimalen Lichtausnutzung abgeschätzt werden. Zudem kann die Simulation Basis einer automatisiert gesteuerten Abwasseraufbereitung sein, welche in Abgleich mit akuten Wetterdaten sowie der Wettervorhersage und entsprechend der ihr zugrunde liegenden Modelle den Prozess anpasst.

Der Einfluss der Temperatur wurde bislang in den Konzepten und Experimenten der vorliegenden Arbeit durch konstante Temperierung ausgeschlossen. Die Abwasseraufbereitung im Außenbereich unterliegt klimatisch bedingten Schwankungen, wodurch keine gleichbleibende Temperatur gewährleistet werden kann. Eine externe Temperierung ist aufgrund des hohen Kostendrucks sowie hinsichtlich der Nachhaltigkeit des Prozesses nicht sinnvoll. In der Literatur ist ein Temperatureinfluss sowohl auf die Filtration und das Membran-Fouling (Chu et al. 2016; Le-Clech et al. 2006; Zhao et al. 2015) als auch die Photosynthese (Ranglová et al. 2019), den Stoffwechsel (Åkerström et al. 2016; Han et al. 2013) und das Wachstum von Mikroalgen (Bernard und Rémond 2012) beschrieben. Bei Temperaturen unterhalb des Optimums für das Mikroalgenwachstums wurde eine verringerte intrazelluläre Stärkeproduktion nachgewiesen (Torzillo et al. 1991), wobei auch die Abnahme der Stärke in der Nacht bei geringeren Temperaturen reduziert war (Ogbonna und Tanaka 1996). Gerade die Bereitstellung von Energie durch die Veratmung von Kohlenstoffspeichern ist ein zentrales Element der vorgestellten Prozessstrategie zur kontinuierlichen Abwasseraufbereitung. Dementsprechend sollte der Temperatureinfluss mit Fokus auf die Stoffwechselaktivitäten der Mikroalgenzellen am Tag und in der Nacht Gegenstand weiterer Forschungsarbeiten sein.

Der Betrieb der beiden Filtrationsanlagen *Harvester* und *Mini-Harvester* wurde im Zuge der vorliegenden Arbeit lediglich für Kurz- und Mittelfristige (mehrere Stunden bis maximal 4 Wochen) Anwendungen getestet. In einem Langzeitfiltrationsexperiment (> 8 Wochen) soll-

ten die identifizierten Maßnahmen zur Fouling-Reduktion (Belüftung, Rückspülen, Pausieren) an beiden Anlagen angewandt und im laufenden Prozess angepasst und optimiert werden. Im Zuge dessen kann durch den flexiblen Aufbau des *Mini-Harvesters* der Test verschiedener Membran-Materialien für einen möglichst Fouling-armen Filtrationsbetrieb geschehen. Ziel dieser Versuche wäre es, einen wartungsarmen Filtrationsbetrieb zu etablieren, um Betriebskosten für eine spätere Anwendung zur Abwasseraufbereitung zu minimieren.

Hinsichtlich der Anlagenkonstruktion wäre am *Harvester* der Einbau einer separaten Pumpe zur Abtrennung von überschüssiger Biomasse sinnvoll. Aktuell ist eine Pumpe eingesetzt, welche abhängig der Stellung eines Ventils Retentat zurück in den Vorlagebehälter oder aber in ein separates Gefäß pumpt. Eine gleichzeitige Rückführung von Zellen in den Photobioreaktor und Abtrennung von Biomasse aus dem System (beispielsweise zur externen Speicherung) ist also nicht möglich. Bei einem Einsatz des *Harvesters* als externe Membraneinheit eines MPBR ist diese Funktion allerdings benötigt, um flexibel auf Umweltbedingungen reagieren zu können (siehe Kapitel 5.1).

Bislang ist es bei einer Kopplung von *Mini-Harvester* und PBR nicht möglich, die Volumenströme von  $F_{\text{Retentat}}$  und  $F_{\text{Rezirkulation}}$ , also die Flüsse zwischen den beiden Anlageneinheiten des MPBR, zu quantifizieren. Aktuell werden die Volumenströme entsprechend der Pumpenkalibrierung über die Pumpendrehzahl eingestellt. Zwar wurde die Kalibrierung sehr präzise durchgeführt, dennoch kann es im Betrieb nach einiger Zeit zu Abweichungen zwischen Soll- und Ist-Fluss kommen. Zudem kommt es an den Innenwänden der eingesetzten Schläuche zur Ausbildung von Mikroalgen-Biofilmen, welche den effektiven Querschnitt der Schläuche verringern und damit den geförderten Volumenstrom reduzieren oder sogar zum Erliegen bringen. Ohne eine prozessbegleitende Quantifizierung der Flüsse kann bei einer Abweichung zwischen Ist- und Soll-Wert keine Anpassung der Pumpendrehzahl geschehen, wodurch es zu einem Absinken des Füllstandes im *Mini-Harvester* und damit zu einer Störung des kontinuierlichen Betriebs kommen kann. Zudem kann ohne regelmäßige (externe) Kontrolle der Flüsse nicht garantiert werden, dass die vorgegebenen Parameter für hydraulische Verweilzeit bzw. Rückführverhältnis tatsächlich während der gesamten Anlagenlaufzeit konstant bzw. auf dem gewünschten Wert eingestellt sind. Ein weiteres Problem stellt die Entnahme von Proben im PBR und am *Mini-Harvester* dar. Der Reaktorinhalt wird über ein Rohr am Kopf des Reaktors abgepumpt, sodass dessen Leerlaufen verhindert wird. Sinkt der Füllstand durch eine Probenahme ab, wird für eine kurze Zeitspanne folglich kein Reaktorinhalt in Richtung *Mini-Harvester* transportiert. Aufgrund des geringen Anlagenvolumens von  $\sim 100$  mL kann es dadurch zu einem Absinken des Füllstandes und damit zu einer Störung des Filtrationsbetriebs kommen. Dies wird auch durch Probenahmen am *Mini-Harvester* selbst (Retentat) hervorgerufen. Aus diesem Grund wurde die Probenahme für die in Kapitel 5.2.1 vorgestellten Experimente reduziert, wodurch die Aussagekraft der Versuche limitiert wird. Eine Verlängerung des Rohres am *Mini-Harvester* zur Erzeugung eines Puffervolumens von 50 mL könnte diese Problemstellung beheben. Zwar erzeugt das über der Membran liegende Flüssigkeitsvolumen einen hydrostatischen Druck, dieser kann jedoch durch die automatisierte Regelung des Filtrat-Flux ausgeglichen werden. Nach einer Probenahme würde so das Volumen im *Mini-Harvester* zwar absinken, allerdings den laufenden Betrieb damit nicht beeinflussen.

Nach der erfolgreichen Inbetriebnahme des MPBR-Systems sowie ersten Kultivierungsexperimenten mit Zellrückführung (Kapitel 5.2.1) sind weitere Experimente zur Ausarbeitung und Verifizierung der mikroalgenbasierten Abwasseraufbereitungsstrategie denkbar. In einer Versuchsreihe kann die Nährstoffaufnahme bei Nacht sowie der Einfluss der Rückführung von Zellen im Detail untersucht werden. Wie aus den Versuchen der vorliegenden Arbeit hervorgeht, sind Algenzellen in der Lage, Nährstoffe auch bei Abwesenheit von Licht aus dem Medium aufzunehmen, bei einer gleichzeitigen Reduktion intrazellulärer Speicherstoffe. Im Zuge einer kontinuierlichen Kultivierung mit einem Hell/Dunkel-Regime könnte während der Hellphase (ohne Zellrückführung) Biomasse mit unterschiedlichem Kohlehydrat- und Lipidspeicher erzeugt werden. Bei Anwendung einer konstanten Durchflussrate kann dies durch variierende Stickstoffkonzentrationen im Medium realisiert werden, um unterschiedlich ausgeprägte Mangelzustände bezüglich des Nährstoffs auszulösen und damit die Speicherstoffsynthese zu induzieren. Wird zu Beginn der Dunkelphase Stickstoff in den PBR gegeben, kann der Schwellenwert des minimalen Gehaltes an Speicherstoffen für eine vollständige Nährstoffaufnahme ermittelt werden. Um diesen Grenzwert für unterschiedliche Beladungen an Nährstoffen zu ermitteln, kann der Versuchsaufbau für variierende Durchflussraten bzw. unterschiedliche Stickstoffkonzentrationen wiederholt werden. Dabei kann der gleichzeitige Einsatz der Zellrückführung als Einflussparameter miteinbezogen werden. Zunächst verhindert die Rückführung von Biomasse ein Auswaschen der Zellen auch bei hohen Durchflussraten oberhalb von  $\mu_{\max, \text{Nacht}}$ . Zudem ist durch eine Variation der Rückführrate eine Aussage darüber möglich, ob die Erhöhung der Biomassekonzentration während der Dunkelphase geringe intrazelluläre Energiespeicher ausgleichen kann. So kann die Nährstoffaufnahme von Ansätzen mit wenigen Zellen mit hohem Gehalt an Speicherkomponenten mit hohen Biomassekonzentrationen mit geringen Energiespeichern verglichen werden. Die Kenntnis der Dynamik der nächtlichen Nährstoffaufnahme in Abhängigkeit der intrazellulären Energiespeicher ist ein wesentlicher Bestandteil in der Ausarbeitung einer automatisierten Prozessstrategie zur mikroalgenbasierten Abwasseraufbereitung unter realen Umweltbedingungen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten zeigen, dass eine Zellrückführung als Werkzeug für eine vollständige Nährstoffaufnahme aus einem Abwasser während einer kontinuierlichen Kultivierung ermöglicht (Kapitel 5.1). Die Steigerung der Biomassekonzentration im Reaktor (entspricht einer Erhöhung der SRT) führt allerdings nur innerhalb gewisser Grenzen zu einer verbesserten Nährstoffassimilation, da ein Schwellenwert der spezifischen Photonenvfügbarkeit nicht unterschritten werden darf. In einer weiteren Versuchsreihe kann der Zusammenhang zwischen variierender SRT (erzeugt durch verschiedene Rückführraten) und der daraus resultierenden spezifischen Lichtverfügbarkeit zur vollständigen Nährstoffaufnahme untersucht werden. In Zusammenhang mit der Kenntnis über den intrazellulären Speicherbedarf während der Nachtphase aus dem vorhergehenden Abschnitt kann dieses Wissen zur weiteren Ausarbeitung der Prozessstrategie sowie für die Simulation des Prozesses dienen.

Der metabolischen Aktivitäten von Mikroalgen während der Nacht wurden bisher in der Literatur nur am Rande untersucht. Ein gezieltes Screening nach Mikroalgen mit effizientem und schnellem Metabolismus bei Abwesenheit von Licht kann den Abwasseraufbereitungsprozess weiter optimieren.

# 7 Literatur-Anhang

## 7.1 Advanced near-zero waste treatment of food processing wastewater with water, carbon, and nutrient recovery

**DOI:** 10.1016/j.scitotenv.2021.146373

**Journal:** Science of the Total Environment, 2021, Volume 779, Artikelnummer 146373

**Autoren:** Amit Dan Grossman, Yonas Zeslase Belete, Sammy Boussiba, Uri Yogev, Clemens Posten, Franziska Ortiz Tena, Laurenz Thomsen, Song Wang, Amit Gross, Stefan Leu, Roy Bernstein

### Zusammenfassung

In der vorliegenden Veröffentlichung wurde ein „Zero-Waste“ Aufbereitungssystem für Abwässer aus der Lebensmittelverarbeitung entwickelt und untersucht. Das Abwasser wurde nach einer ersten Reinigungsstufe einem anaeroben Membranbioreaktor (AnMBR) in einem Photobioreaktor im Außenbereich durch die Kultivierung von Mikroalgen (drei Spezies) weiter geklärt. Überschüssiger Schlamm der ersten Reinigungsstufe wurde mittels hydrothermale Karbonisierung umgesetzt. Die Versuche wurden unter ariden Klimabedingungen über ein Jahr (vier Jahreszeiten) durchgeführt. Der AnMBR reduzierte den gesamten organischen Kohlenstoff des Abwassers um 97 %, welcher größtenteils als Methan (~57 %) und Hydrochar (~4 %) zurückgewonnen wurde. Die Produktivität der Mikroalgen-Biomasse im AnMBR-Abwasser variierte zwischen 0,25 und 0,8 g·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>. Die Aufnahme von Stickstoff (N) und Phosphor (P) schwankte saisonal zwischen 18 und 45 mg·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> bzw. bis zu 5 mg·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>. Eine Massenbilanz der Elemente der Stickstoff und Phosphor zeigte eine effiziente Rückgewinnung von Stickstoff (~77 %) und Phosphor (~91 %) in der gebildeten Mikroalgenbiomasse. Die Nährstoffaufnahme der Mikroalgenkultur schwankte speziesabhängig in Abhängigkeit der Jahreszeiten aufgrund unterschiedlicher klimatischer Bedingungen, sowie aufgrund der variablen Abwasserbelastung. Die Grenzwerte für die Aufbereitung von Abwässern wurden ganzjährig eingehalten und im Sommer innerhalb von zwei Tagen, im Winter innerhalb von 4,5 Tagen erreicht. Die Versuche konnten zeigen, dass der Prozess in der Lage ist, qualitativ hochwertiges Wasser aus einem Abwasser zu produzieren, Nährstoffe und Kohlenstoff in Mikroalgenbiomasse zurückzugewinnen und Energie in Form von Biogas und Hydrochar zu erzeugen.



## Advanced near-zero waste treatment of food processing wastewater with water, carbon, and nutrient recovery

Amit Dan Grossman<sup>a,1</sup>, Yonas Zeslase Belete<sup>a,1</sup>, Sammy Boussiba<sup>b</sup>, Uri Yogev<sup>c</sup>, Clemens Posten<sup>d</sup>, Franziska Ortiz Tena<sup>d</sup>, Laurenz Thomsen<sup>e</sup>, Song Wang<sup>e</sup>, Amit Gross<sup>a</sup>, Stefan Leu<sup>b,\*</sup>, Roy Bernstein<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Zuckerberg Institute for Water Research, The Jacob Blaustein Institutes for Desert Research, Ben-Gurion University of the Negev, Sede-Boqer Campus, 84990, Israel

<sup>b</sup> Microalgal Biotechnology Laboratory, French Associates Institute for Agriculture and Biotechnology of Drylands, The Jacob Blaustein Institutes for Desert Research, Ben-Gurion University of the Negev, Sede-Boqer Campus, 84990, Israel

<sup>c</sup> National Center for Mariculture, Israel Oceanographic and Limnological Research Institute, 88112 Eilat, Israel

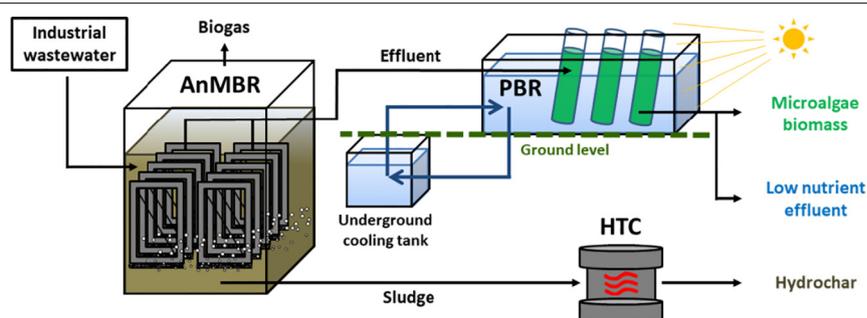
<sup>d</sup> Karlsruhe Institute for Technology, Institute of Process Engineering in Life Sciences, Bioprocess Engineering, Fritz-Haber-Weg 2, 76131 Karlsruhe, Germany

<sup>e</sup> Department of Physics and Earth Sciences, Jacobs University Bremen, Campus Ring 1, 28759 Bremen, Germany

### HIGHLIGHTS

- An AnMBR combined with outdoor microalgal cultivation and HTC was studied.
- Carbon was recovered as biogas and hydrochar.
- Nitrogen and phosphorous were recovered as microalgal biomass.
- Effluent for reuse was obtained after two days in summer and five days in winter.
- Near-zero waste treatment of food processing wastewater was demonstrated.

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 19 January 2021

Received in revised form 4 March 2021

Accepted 5 March 2021

Available online 11 March 2021

Edited by: Huu Hao Ngo

#### Keywords:

Anaerobic membrane bioreactor

Food industry wastewater

Microalgal cultivation

Nutrient recovery

Hydrothermal carbonization

Outdoor photobioreactor

### ABSTRACT

A near-zero waste treatment system for food processing wastewater was developed and studied. The wastewater was treated using an anaerobic membrane bioreactor (AnMBR), polished using an outdoor photobioreactor for microalgal cultivation (three species were studied), and excess sludge was treated using hydrothermal carbonization. The study was conducted under arid climate conditions for one year (four seasons). The AnMBR reduced the total organic carbon by 97%, which was mostly recovered as methane (~57%) and hydrochar (~4%). Microalgal biomass productivity in the AnMBR effluent ranged from 0.25 to 0.8 g · L<sup>-1</sup> · day<sup>-1</sup>. Nitrogen (N) and phosphorous (P) uptake varied seasonally, from 18 to 45 mg · L<sup>-1</sup> · day<sup>-1</sup> and up to 5 mg · L<sup>-1</sup> · day<sup>-1</sup>, respectively. N and P mass balance analysis demonstrated that the process was highly efficient in the recovery of nitrogen (~77%), and phosphorus (~91%). The performance of the microalgal culture changed among seasons because of climatic variation, as a result of variation in the wastewater chemistry, and possibly due to differences among the microalgal species. Effluent standards for irrigation use were met throughout the year and were achieved within two days in summer and 4.5 days in winter. Overall, the study demonstrated a near-zero waste discharge system capable of producing high-quality effluent, achieving nutrient and carbon recovery into microalgal biomass, and energy production as biogas and hydrochar.

© 2021 Published by Elsevier B.V.

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [stefanleu3@gmail.com](mailto:stefanleu3@gmail.com) (S. Leu), [royber@bgu.ac.il](mailto:royber@bgu.ac.il) (R. Bernstein).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this manuscript.

## 1. Introduction

Wastewater is increasingly being recognized as important water, energy, and nutrient resource (Batstone et al., 2015; Tee et al., 2016). However, commonly used wastewater treatment (WWT) technologies (namely, activated sludge) are energy-intensive, and underuse or neglect the recovery of stored energy and the valuable nutrients phosphorous (P) and nitrogen (N) (Hunter et al., 2019; Li et al., 2020). Furthermore, these technologies often generate substantial quantities of greenhouse gases and large volumes of unwanted residual sludge (Maktabifard et al., 2020). The use of anaerobic membrane bioreactors (AnMBRs) presents a promising low carbon footprint alternative to common WWTs for organic matter decomposition and energy recovery (Maaz et al., 2019; Robles et al., 2020b). In particular, AnMBRs are very applicable to the treatment of high-strength industrial wastewaters including food processing wastewater, in which the total organic carbon (TOC) concentration is high (often  $>0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) and mostly biodegradable (Dereli et al., 2012; Tee et al., 2016).

The application of AnMBRs in industrial WWT, and more recently for urban wastewaters with a positive energy balance, has been reported at laboratory and pilot plant scales (Galib et al., 2016; Robles et al., 2020b), and full-scale systems are expected to be operational in coming years (Cashman et al., 2018; Pretel et al., 2016; Robles et al., 2020b; Smith et al., 2014). Nevertheless, AnMBR produces nutrient-rich effluent (particularly N and P) and therefore a post-treatment step for nutrient removal may be required prior to subsequent discharge or reuse. Fortunately, under several scenarios, the very low level of nutrient removal can be regarded as an advantage of the technology, as the nutrients can be easily recovered from the high-quality effluent (Robles et al., 2020a). Nutrient recovery can also increase the sustainability of AnMBRs, and help meet production costs (Robles et al., 2020a; Smith et al., 2012). In addition, interestingly, for most part, the produced sludge and its treatment has been neglected in these studies.

A widely used and understood sustainable WWT process specifically for reducing nutrients is microalgal cultivation (D'Imporzano et al., 2018; Mohsenpour et al., 2021; Nagarajan et al., 2020), and the potential for valorization of the microalgal biomass following cultivation is an added advantage of this approach (Khoo et al., 2019). In particular, the nutrient-rich effluent from anaerobic treatment of food processing wastewater and the  $\text{CO}_2$  that is produced during this process provide ideal substrates for microalgal cultivation (de Assis et al., 2019; Ferreira et al., 2017).

The use of microalgae as a polishing step to reduce nutrients, carbon, metals, and other toxic compounds in effluents from various sources has been widely investigated and applied at large scales, predominantly using raceway pond configurations (K. Li et al., 2019; Manninen et al., 2016; Robles et al., 2020a). However, the application of raceways pond in water recovery following cultivation in arid subtropical climates can be challenging because of the high levels of water evaporation, especially when the effluent contains a high nutrient load (Handler et al., 2012; Nwoba et al., 2016). Cultivation in closed or hybrid reactors, such as photobioreactors (PBRs) (Koller et al., 2012; Song et al., 2020), can limit water evaporation and also improve the overall process (Cai et al., 2013).

The successful combination of AnMBRs with microalgal post-treatment of effluent in PBRs has been demonstrated in several studies (Pretel et al., 2016; Viruela et al., 2018; Vu et al., 2020). González-Camejo et al. (2019a) recently highlighted the importance of parameters including temperature, irradiance, the light path, and non-controlled variables including P and N levels on nutrient removal rates and process efficiency during long-term outdoor polishing of AnMBR effluent. The importance of these parameters on process efficiency was demonstrated during a three-year study of PBR-based outdoor microalgal cultivation using AnMBR effluent (González-Camejo et al., 2020). However, although the influent in many of these studies was domestic wastewater, and thus contained relatively low total nitrogen (TN) concentrations ( $30\text{--}80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), long hydraulic retention times (HRTs) in the PBR (typically 4–6 days) were needed to meet

water quality standards for unrestricted reuse because of the low rate of TN uptake. Longer HRTs are expected in the treatment of effluent containing high nutrient loadings, such as food industry wastewater (Cai et al., 2013). Long HRTs impose high cooling and energy costs, and high levels of water loss from the treated effluent because of water evaporation. Furthermore, many of these studies have been conducted under controlled temperature conditions and with supplementary irradiation provided. As noted above, the seasonal variability of microalgal productivity can pose a major challenge in the operation of microalgal-based remediation processes. It is therefore important that such processes be tested under realistic outdoor setup conditions that span all seasonal climate variations, and under natural conditions without temperature control and artificial light (González-Camejo et al., 2017; Hulatt and Thomas, 2011).

The goal of this study was to develop, investigate, and analyze, for the first time, a long-term treatment train of food-processing wastewater using an AnMBR, outdoor PBR microalgal cultivation, and sludge treatment by hydrothermal carbonization under ambient arid-desert climate conditions. The aim was to achieve a near-zero waste production of high-quality effluent and biomass involving effective recovery of nutrients, carbon, and energy.

## 2. Materials and methods

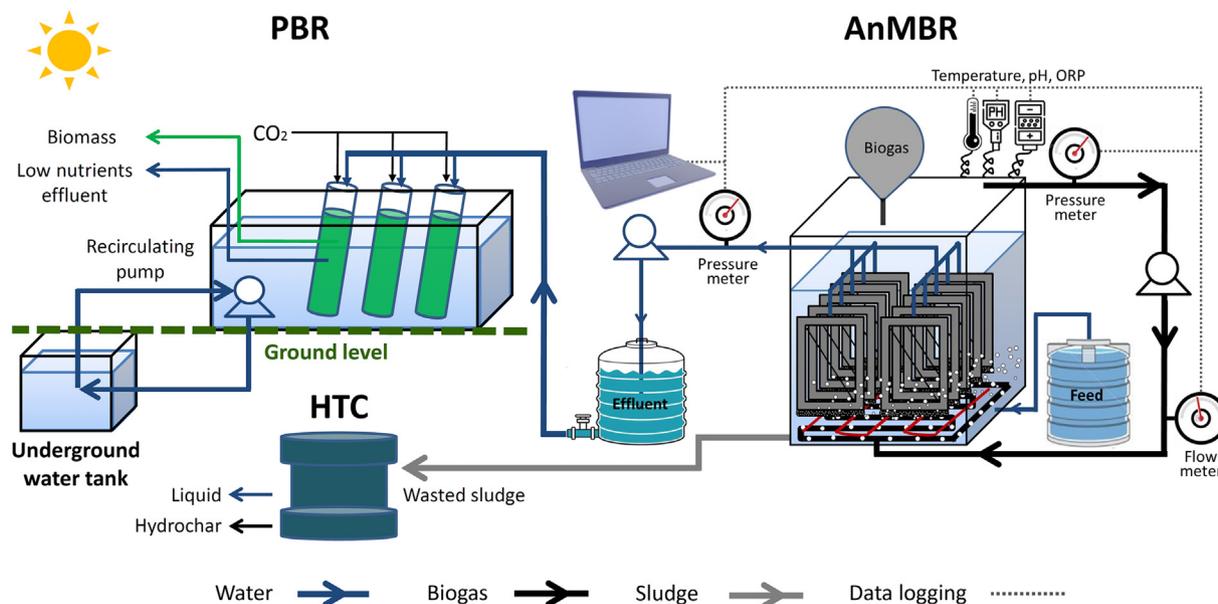
### 2.1. Laboratory-scale submerged anaerobic membrane bioreactor

A 15-L high-throughput submerged AnMBR (schematically shown in Fig. 1) equipped with six membranes (PES 150 kDa; Microdyn-Nadir, Germany) was built and operated (the AnMBR operational conditions are listed in Table S1) for more than two years (Grossman et al., 2019) at the Sde Boker campus of Ben-Gurion University (Israel). The reactor was fed with industrial wastewater from a potato and corn snack factory (Strauss Frito Lay; Sha'ar Hanegev, Israel). The wastewater was tested every three days, as described in Section 2.4. The membrane filtration was conducted under sub-critical flux using 9 min of filtration and 1 min of backwash. The critical flux was measured as described by (Diez et al., 2014). The membrane was chemically cleaned every 3–4 months by soaking in 0.5% NaOCl for 30 min. The biogas composition and production were measured daily using a biogas analyzer (Biogas 5000; Geotech, UK).

### 2.2. Microalgal cultivation

Three microalgae species were tested in the PBR: two local thermotolerant strains of *Coelastrella* sp. (similar to *C. saipanensis*) and *Chlorella* sp. was also isolated at Sde Boker (Belete et al., 2019), and *Scenedesmus* sp., isolated and tested previously in Germany for wastewater applications (Han et al., 2019). Each microalgal species was cultivated as a monoculture in the outdoor PBR located in the Sde Boker campus of Ben-Gurion University (Israel) under an arid climate in an effective volume of 2.5 L in a glass column (8 cm diameter) angled at approximately  $20^\circ$  from vertical. The columns of microalgae were positioned 16 cm from each other and had a horizontally illuminated area of  $256 \text{ cm}^2$  and a total transparent area of approximately  $1108 \text{ cm}^2$ . The columns were thermoregulated in a water bath that provided cool water from a below-ground reservoir; the reservoir water was circulated to and from the water bath (Fig. 1). Evaporation losses of water from the columns and the water bath were measured daily to estimate water loss per  $\text{m}^2$  per season. By shading the reactor from both sides, it was estimated that 39 of these columns could be placed in a  $1 \text{ m}^2$  water bath, resulting in 97.5 L of reactor volume per square meter (see Fig. S1).

Before starting the outdoor experiments, the microalgae were adapted to and tested in the AnMBR effluent (supplemented with Fe-EDTA and the stock solution of microelements for the mBG11 medium) in indoor conditions in 150 mL Erlenmeyer flasks, as described previously (Belete et al., 2019). The microalgae were then transferred



**Fig. 1.** Schematic illustration of the thermoregulation system for combined treatment of industrial wastewater using an anaerobic membrane bioreactor (AnMBR), hydrothermal carbonization (HTC), and an outdoor photobioreactor (PBR). The PBR was operated as a batch reactor in semi-continuous mode using one column for each microalgal species.

to the columns and supplied ( $1 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ ) with an air:CO<sub>2</sub> (98:2) mixture for an outdoor adaptation period of one week before measurements commenced. The outdoor microalgal cultivation was repeated in spring (May), summer (July), fall (November/December), and winter (December/January). Distinct growth cycles (3–4) were measured in each season in a semi-continuous mode. Fresh effluent was introduced every 4–7 days in each growth cycle, using a culture dilution ratio of 1:5 (0.5 L of culture with 2 L of fresh AnMBR effluent).

### 2.3. Hydrochar production

Sludge from the AnMBR was collected, dried, and weighed along the experiment followed by its hydrothermal carbonization according to (Belete et al., 2020, Belete et al., 2019). Briefly, HTC of the AnMBR sludge was carried out in 50 mL stainless steel tubular reactor by introducing 12 g dry sludge to each reactor and water at a ratio of 1:3 (W/V). The reactor was heated to 210 °C for 4 h by immersion in Paratherm HR heat transfer fluid after which the reactor was placed in an ice bath to rapidly reduce the temperature (Belete et al., 2020, Belete et al., 2019). The resulting slurry was centrifuged, and the wet hydrochar was dried at 105 °C. Elemental content (C, H, N, and S) of the HTC was measured using a CHNS-O analyzer (Flash 2000 Elemental Analyzer; Thermo Fisher Scientific Inc., UK). The remaining mass after the subtraction of ash, C, H, N, and S was considered to be the oxygen content (ASTM-D3176, 2015). The ash content was determined by heating samples at 450 °C for 6 h in a muffle furnace (Van Hue and Evans, 1986).

### 2.4. Water and biomass characterization

During each growth cycle, the microalgal growth (measured based on dry weight), TN, total ammonia nitrogen (TAN), and total phosphorus (TP) concentrations in the growth medium were determined daily for 50 mL samples collected at noon from each column. The microalgal biomass dry weight was measured by filtering duplicate 5 mL samples of culture through weighed GF/C filters, and determining the dry weight as described by Belete et al. (2019). The remaining 40 mL of culture was centrifuged at 3000 rpm for 10 min, and the supernatants were stored for nutrient and water analyses. The microalgal pellets were washed in deionized water and stored at  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  for measurement of the phosphate content or biomass characterization.

The biomass production ( $P_x$ ) and the TN, TAN, and TP uptake were calculated using the equation:

$$P_x = \frac{C_f - C_i}{\Delta t_c}$$

where  $C_i$  is the initial biomass,  $C_f$  is the final biomass, N or P concentrations ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) during a growth cycle at  $\Delta t_c$  of semi-continuous operation. The biomass productivity and the TN, TP, and TAN removal rates were measured in each growth cycle ( $\Delta t_c$ ) from the point of dilution with fresh effluent to the day when the TN concentration reached the Israeli TN standard for unrestricted irrigation ( $<25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Seasonal productivities were calculated as the average of 3–4 subsequent growth cycles.

The food industry wastewater, AnMBR effluents, and microalgal-treated supernatants (following harvesting of the microalgae) were characterized by chemical analysis. The electrical conductivity (EC) and pH were measured using CyberScan Con11 and pH 11 meters (Eutech Instruments Pvt. Ltd., Singapore), respectively; TN, TOC, dissolved inorganic carbon (DIC), and dissolved organic carbon (DOC) were measured using a TOC analyzer (Multi N/C; Analytik-Jena, Germany); the TAN was measured using Nessler's reagent method (APHA, 2005); total suspended solids (TSS) were measured by gravimetry; and macro/micronutrients were determined using an inductively coupled plasma (ICP) analyzer (Spectra, Germany). The analyses were performed using standard methods as described elsewhere (Belete et al., 2019). The HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> concentration in the AnMBR effluent was calculated from alkalinity analysis and pH (APHA, 2017). The P content in the microalgal biomass was determined following digestion of the microalgae in a microwave digestion system (ETHOS UP; Milestone, Italy). The dry biomass (up to 50 mg) was dispersed in 8 mL of 65% HNO<sub>3</sub> and 2 mL of 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and placed in a 100 mL PTFE-TFM-Teflon microwave vessel. The digestion was performed for 30 min at a maximum temperature of 210 °C, resulting in the microalgae being fully decomposed into the solution. The liquid was filtered and the TP concentration was measured using ICP.

### 2.5. Statistical analysis

The differences in biomass productivity and nutrient uptake among the three species in each season, and among the four seasons for each species, were analyzed using a two-way analysis of variance (ANOVA)

followed by post hoc Tukey honestly significant difference (HSD) statistical analysis, using Rstudio 1.1.463 for R 3.5.1 software (R Foundation for Statistical Computing).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Industrial wastewater treatment using AnMBR

The characteristics of raw wastewater and the AnMBR-treated effluent are shown in Table 1. The removal of TSS and TOC exceeded 99% and 97% throughout the experiment, respectively, and constant removal of TOC in the AnMBR was obtained despite varying TOC concentrations in the influent. The TN and TP concentrations in the influent and the AnMBR effluent were similar, and a large proportion of the TN was converted from organic N in the influent to TAN in the AnMBR effluent (Table 1). The increase in effluent conductivity (EC) was due to the addition of NaOH, which was needed to maintain a constant pH; this increase in EC might be reduced by replacing NaOH with  $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$  to control pH in the AnMBR. It is noteworthy that the EC of most food processing wastewaters makes the effluent applicable for irrigation of tolerant crops (such as dates or tomatoes) or in hydroponics (Power and Jones, 2016). Alternatively, the effluent could be diluted to lower the salinity for unrestricted irrigation ( $\text{EC} < 1.4 \text{ mS/cm}$  in Israel). Macro- and micro-elements concentrations other than sodium (because of the addition of NaOH) did not change (Table S2).

One of the main advantages of the use of AnMBR is the recovery of organic carbon in the form of biogas. The average biogas production during the WWT was  $12.4 \pm 3.1 \text{ L}\cdot\text{day}^{-1}$ ; the average composition of the biogas included  $81.6 \pm 6.4\% \text{ CH}_4$ ,  $18.5 \pm 3.4\% \text{ CO}_2$ , and  $1230 \pm 510 \text{ ppm}$  of  $\text{H}_2\text{S}$ . An average of 0.3 g of excess dry AnMBR sludge was obtained per L of treated wastewater, resulting in a solid retention time (SRT) to HRT ratio of approximately 30, typically found for AnMBRs treating industrial wastewater (Dereli et al., 2012); to obtain a near-zero waste discharge, the organic carbon in the sludge was recovered in the form of hydrochar, as discussed below.

A critical challenge in AnMBR operation is membrane fouling, which causes an increase in the trans-membrane pressure (TMP) with increasing filtration time. In this study, the fouling was kept to a relatively low level, as evidenced by the stable TMP during the experiments ( $-15 < \text{TMP} < -40 \text{ mbar}$ ). This was achieved by applying a relatively low flux (average flux:  $J_v = 4 \text{ L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ), which was much lower than the critical flux ( $\sim 12 \text{ L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ), and by implementing biogas sparging and backwashing of the membrane, as described in details by (Grossman et al., 2019).

#### 3.2. Microalgal cultivation, nutrient uptake, and effluent characteristics

##### 3.2.1. Biomass growth and productivity

The biomass of each microalgal species and changes in the nutrient concentrations (TN, TAN, and TP) in the growth medium were measured daily during each of the four seasons for 3–4 semi-continuous

**Table 1**  
Water quality and process performance in the AnMBR.

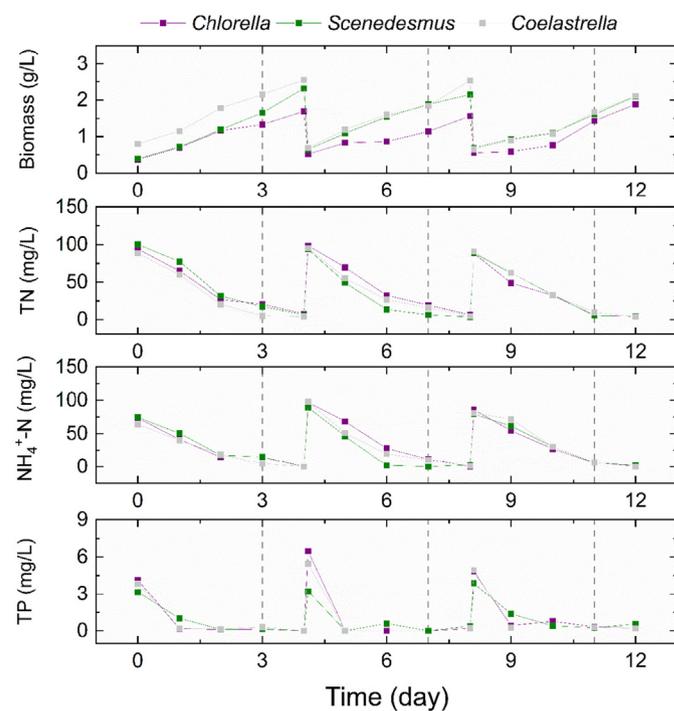
Parameter*	Influent (feed)	Effluent (permeate)	Removal (%)
TSS ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$2093 \pm 199$	$<10$	$>99.9\%$
TOC ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$1520 \pm 715$	$32.3 \pm 6.5$	$97.9\%$
DOC ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$916 \pm 95$	$32.3 \pm 6.5$	$96.5\%$
TN ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$127 \pm 62$	$118 \pm 12$	$6.7\%$
TAN ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$<10$	$86 \pm 30$	–
TP ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$9.9 \pm 4.8$	$9.2 \pm 4.5$	$7.1\%$
pH	$7.0 \pm 0.2$	$7.3 \pm 0.2$	–
EC (mS/cm)	$2.2 \pm 0.3$	$3.0 \pm 0.4$	–

\* TSS = total suspended solids; TOC = total organic carbon; DOC = dissolved organic carbon; EC = electric conductivity.

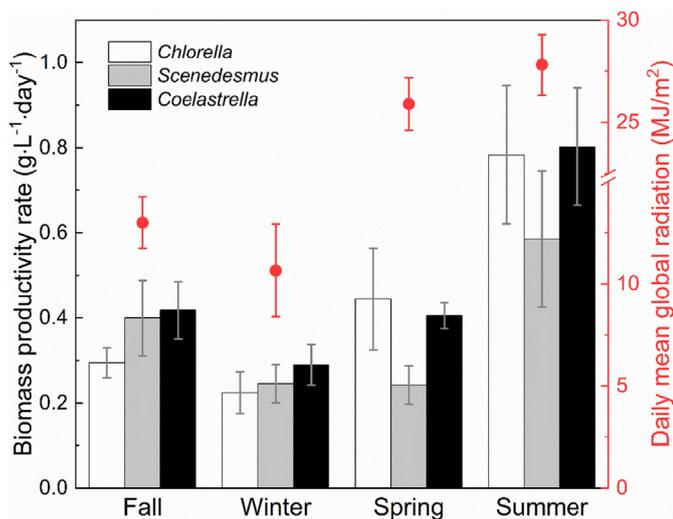
dilution cycles. The results for late fall as a representative growth season that was also used for the mass balance calculations described below, are shown in Fig. 2. The growth periods in summer, winter, and spring are shown in Figs. S2–4. The dashed lines in Fig. 2 and Figs. S1–3 represent the number of days required to reach the Israel regulatory standard for unrestricted irrigation ( $\text{TN} < 25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (Inbar, 2007); the TP concentrations were always below the required limit ( $< 5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). On average, the effluent reached the regulatory TN and TP concentrations within 2.5 days in summer, 3 days in fall, and 4.3 days in winter. For the spring period, in 3 of the 4 dilutions there was only sufficient phosphate in the effluent to achieve an average P:N ratio of approximately 1:20, which limited algal growth and N-uptake; in the three other growth periods, more adequate ratios for growth (1:10–1:12) were maintained.

The average biomass productivity for each species and in each season (measured based on Fig. 2 and Figs. S2–4) are shown in Fig. 3. The biomass productivity for all species was higher in summer than in the three other seasons ( $p < 0.05$ ), besides for *Scenedesmus* that was similar between summer and fall ( $p = 0.5$ ). The high productivity in summer correlated well with higher incident solar radiation and daylight hours (Figs. 3 and S5) (Chu et al., 2015). However, the biomass productivity for all three species in May was less than expected, based on radiation levels. Generally, growth under natural outdoor conditions (irradiation and temperature) and in real effluent with fluctuating nutrients concentrations can be highly variable (Li et al., 2019a). We found that during spring the TAN concentrations were much lower than in fall and winter ( $p < 0.01$ ) (see Fig. 2 and Figs. S2–4), probably because of the lower level of conversion of TN to TAN during spring in the AnMBR (Fig. S3), and as noted above we found sub-optimal P concentrations ( $\text{TP} < 2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) in several cycles (Fig. S3). The resulting high TAN:TP ratio during spring may explain why the biomass production in spring was lower than expected.

Differences in biomass productivity (and nutrient uptake, as discussed below) among the three species were recorded. As the species



**Fig. 2.** The change in the biomass, TN, TAN, and TP concentrations during three cycles of growth of the microalgae *Chlorella* (purple), *Scenedesmus* (green), and *Coelastrrella* (grey) in late fall (November 24th to December 6th). Vertical grey dashed lines represent the day in each cycle where both the TN and TP met the Israeli regulation standards for unlimited irrigation ( $\text{TN} < 25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{TP} < 5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



**Fig. 3.** Average biomass productivity ( $n = 3-4$ ) of the three species during the four seasons, calculated for the treatment times required to achieve  $\text{TN} < 25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  in the culture supernatant. The red circles are the daily mean global radiation for the four seasons. Error bars indicate the standard deviation. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

tested here were isolated from areas having different climate conditions, the biomass differences may be attributable to the adaptation of the microalgae to summer or winter climates (i.e., species-specific seasonal effects) (Ferro et al., 2018; Li et al., 2019b). Specifically, the similar biomass productivity of *Scenedesmus* between summer and fall suggests that this species, which was isolated in temperate Europe, is more sensitive to a summer desert climate compared with the other two species, which were isolated in Israel. In summer (Fig. S4), during most cycles the cold climate *Scenedesmus* strain was less productive (25–30% less) than the *Chlorella* and *Coelastrella* strains, which were locally isolated under desert conditions. In winter and fall (Figs. 3 and S2) the *Chlorella* strain was 15–25% less productive than the two other strains. However, the differences in the biomass productivity among the three microalgae in particular seasons were not statistically significant, probably because of variations in effluent quality and climate conditions that were found among the cycles in those seasons. Further controlled systematic research should be conducted to test this hypothesis.

### 3.2.2. Nutrient uptake

The average TN and TAN uptake by the three species during the four seasons is presented in Fig. 4. The changes in the TN uptake by each

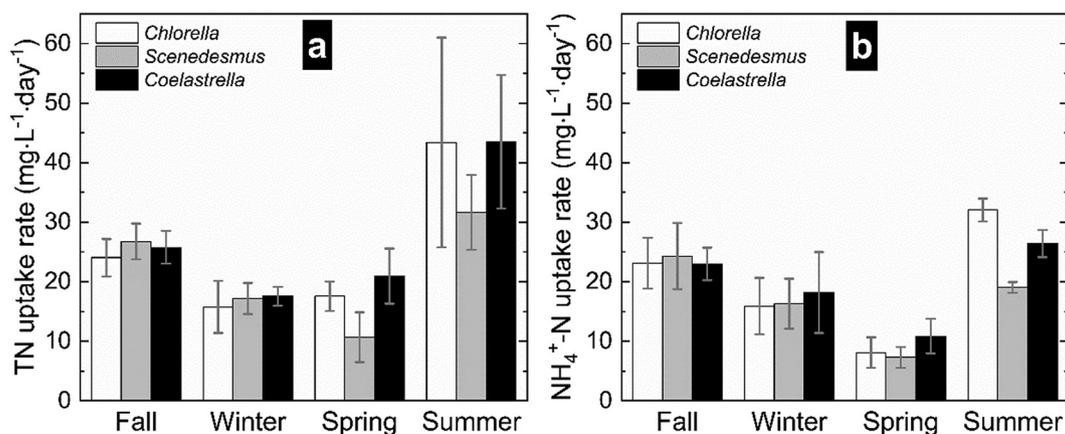
species among seasons (Fig. 4a) were correlated with the changes in biomass productivity that was discussed above (Fig. 3). The TN uptake by all species was significantly higher ( $p < 0.05$ ) in summer than in spring and winter (apart from *Scenedesmus*, which showed similar TN uptake in winter and summer), but not higher than in fall ( $p = 0.5$ ). In addition, no significant differences in TN uptake were found among the three species in each season. The average TAN uptake (Fig. 4b) was similar to the TN uptake, with the exception of *Scenedesmus*, which had a similar TAN uptake in each season but a marginally significantly higher uptake ( $p = 0.08$ ) in summer than in spring. It was also found that the TAN uptake of *Chlorella* was marginally significantly higher than that of *Scenedesmus* during summer ( $p = 0.09$ ), which supports the assumption that the performance of the desert-isolated species was slightly better than that of the species isolated from a temperate climate.

The TP was fully metabolized by all three species within the first two days of cultivation in every season (including spring), and no significant differences in the TP uptake were found between the species within any season, or for each species among seasons (Fig. S6). Moreover, while the TP was exhausted long before the TN in every growth period, the microalgal biomass continued to increase, and the measured TN uptake (until  $\text{TN} < 25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) was not affected by the low TP concentrations (Fig. 2 and Figs. S2–4). Microalgal growth following TP depletion has been reported previously and explained by the ability of the microalgae to accumulate P in the cell in the form of polyphosphate, which is slowly utilized during the growth cycle (Shilton, 2014).

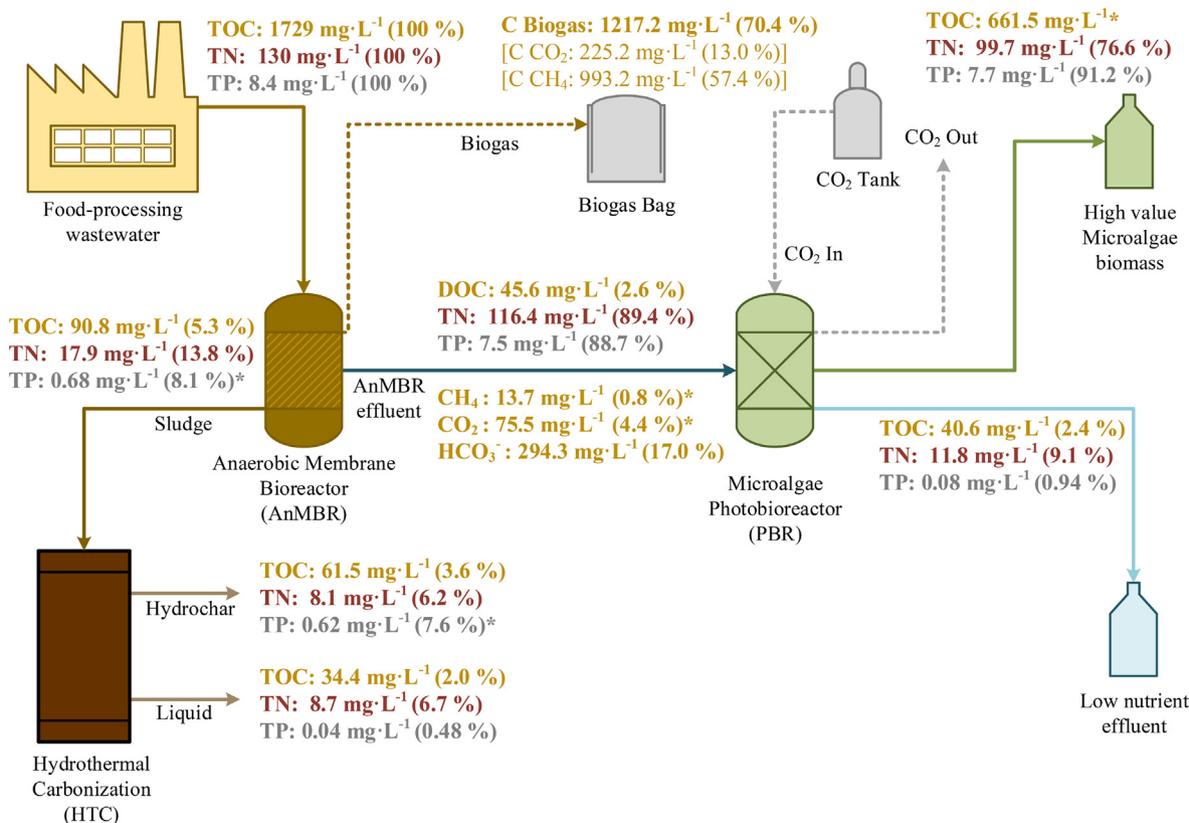
The DOC in the effluent was measured before and after cultivation and remained between 30 and 40  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (approximating the Israeli DOC standard of 30  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  for irrigation use). The relatively steady DOC concentrations may have been a consequence of the low biodegradability of the residual DOC in the effluent, or because of an equilibrium between DOC degradation and the excretion of biopolymers, but this was not investigated in this research.

### 3.3. Mass balance

The elemental mass balance for C, N, and P was analyzed for the fall series to confirm data consistency and obtain a detailed assessment of the process performance (Fig. 5). The mass balance for each element was determined using the average values measured in fall; the data for November were closest to the average system performance. The values are standardized per L of feed wastewater (see SI for details) and therefore the values are presented as  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . In Fig. 5 the relative amounts of C, N, and P in the particular streams are shown as a percentage of their values in the wastewater feed. The relative deviation for each element in each growth cycle was generally  $< 10\%$ , demonstrating its reliability.



**Fig. 4.** The average TN (a) and TAN (b) uptake by the three species in the four seasons. The uptakes were measured until the TN concentration was lower than that required for approval for unrestricted irrigation in Israel ( $\text{TN} < 25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Error bars indicate the standard deviation.



**Fig. 5.** Mass balance scheme for the overall process: C (yellow), N (red), P (grey). The percentages shown in parentheses refer to the fraction of each element relative to its initial mass in 1 L of the inlet feed wastewater. Data are the average values for the fall season. \* Calculated data. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

### 3.3.1. Carbon balance

The combined approach of use of an AnMBR and microalgal cultivation was aimed at achieving a carbon-neutral circular biosystem. The average wastewater TOC concentration was 1729 mg·L<sup>-1</sup> during the fall growth period; this value is referenced as 100% in Fig. 5. The DIC in the feed was <30 mg·L<sup>-1</sup>. The C from the wastewater is recovered as biogas and sludge (which was converted to hydrochar), and DOC and DIC in the effluent.

The main carbonaceous product of the AnMBR was biogas. In our system, the average biogas production was approximately 12.4 L·d<sup>-1</sup>; the C fraction in the biogas stream accounted for approximately 70%, of which the CH<sub>4</sub> content was approximately 57% of the total carbon inlet (Eq. S1). In addition to the conversion of the TOC to biogas in the anaerobic reactor, C was also converted to sludge. About 68% of the carbon in the sludge (approximately 5% of the total carbon) was recovered as hydrochar. The average C in the hydrochar was 61.5 mg·L<sup>-1</sup>, accounting for 3.6% of the total C; the remainder (2%) was in the HTC liquid phase. The HTC liquid phase can also be recovered. For example, it can be applied for microalgae cultivation into algal biomass (Belete et al., 2019), or used as a fertilizer (Mau et al., 2019).

The residual C following the AnMBR treatment was DOC, DIC, and dissolved biogas. The DOC in the AnMBR effluent was 2.6% of the TC. In addition, under the gas saturation conditions used (saturation index ≈1), approximately 17% of the C was converted to HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> and eluted in the AnMBR effluent. Moreover, small fractions of the C in the form of dissolved CH<sub>4</sub> (0.8%) and CO<sub>2</sub> (4.4%) were found in the effluent (Eqs. S2–3). Although the C fraction in the dissolved gases in the effluent was low, it needed to be recovered to limit greenhouse gas emissions; this can be achieved during microalgae cultivation (Yadav et al., 2020). Based on the DIC and CO<sub>2</sub> concentrations in the effluent, using this approach a theoretical reduction of approximately 56% in the CO<sub>2</sub>

supplementation needed for continuous mode PBR operation can be obtained (Eq. S4); however, further investigation of this aspect was beyond the scope of this study.

To summarize, based on these calculations the C balance in the process represented approximately 101%, comprising approximately 70% in the biogas, 25% in the effluent, and 6% in the sludge. Of the total carbon in the system, approximately 82% can be used directly as energy (methane; approximately 57%), in hydrochar combustion (~4%), and as a C source (21%) for microalgal cultivation (the DIC fraction). An additional C fraction could be supplied to the PBR from the CO<sub>2</sub> fraction in the biogas (Baral et al., 2020).

### 3.3.2. Nitrogen and phosphorous balance

The nitrogen stream into the PBR, sourced from the AnMBR effluent, comprised mainly ammonium and a small proportion of organic nitrogen. The average amount of TN was approximately 128 mg·L<sup>-1</sup> in the wastewater and 118 mg·L<sup>-1</sup> in the AnMBR effluent, of which TAN comprised an average of approximately 86 mg·L<sup>-1</sup> (TAN/TN, ~0.8). The TN in the sludge (~14%) was further divided between the solid and liquid phases following HTC, with an average of 6.2% in the hydrochar and 6.7% recovered in the liquid phase, both of which could potentially be recovered for further reuse in agriculture or recovered as biogas (Gaur et al., 2020; López Barreiro et al., 2015).

Most of the N was recovered by the microalgae. The average TN in the effluent after an average of 3.4 days in the fall was 12 mg·L<sup>-1</sup>. Therefore, theoretically, the average TN that was consumed by the microalgae was 104 mg·L<sup>-1</sup>. The average measured N content in the biomass after 3.4 days was approximately 8.3% (based on element analysis). Thus, for an average fall biomass growth of approximately 1.05 g·L<sup>-1</sup> in 3.4 days, approximately 91 mg·L<sup>-1</sup> TN was accumulated in the biomass, corresponding to approximately 88% of the TN that

entered the PBR. In addition, the TN in the microalgal biomass at day zero of each growth cycle (following harvesting) was approximately 5.3%, whereas in the biomass on day three it was approximately 8.3%. Thus,  $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  accumulated in the microalgae, so the total N in the biomass was 86% ( $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) of the TN that entered the PBR. To summarize, the TN balance was approximately 99%, of which approximately 77% in the influent was recovered as microalgae biomass, approximately 13% remained in the HTC solid and liquid phases (and could be used as fertilizer, for algae cultivation, or as a soil amendment), and approximately 9% remained in the PBR effluent; this latter could be reduced to zero by extending the HRT in the PBR.

In contrast to the TN uptake by the microalgae, the TP taken up was not proportional to growth but occurred almost instantaneously (within two days or less). Analysis of the P balance revealed that approximately 8% accumulated in the sludge, while 89% remained in the AnMBR effluent. The average TP influx was  $8.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $=100\% \text{ P}$ ), while the AnMBR effluent contained an average of  $7.45 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  P ( $7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  after dilution in the PBR) that accumulated (90% of the TP) in the algae biomass.

### 3.3.3. Photobioreactor performance

The photobioreactor design and characteristics are essential for achieving high performance all year round. In the present design the  $V_{\text{PBR}} = 2.5 \text{ L}$  effective volume collects sun energy from a horizontal footprint area of  $A_{\text{PBR}} = 0.0256 \text{ m}^2$ ,  $A_{\text{PBR}}/V_{\text{PBR}} = 10.2 \text{ m}^{-1}$ , and areal productivity of  $P_{A,X} = 33.2 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ . With average irradiation of  $I_{\text{Sun}} \sim 223 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$  (Fig. S5b) the volumetric energy flux by irradiation is about  $2280 \text{ W} \cdot \text{m}^{-3}$  (or  $197 \text{ MJ} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ ) (see Eq. S5). The photoconversion efficiency (PCE) is then about 4% on average for all seasons which is fairly a high value (Norsker et al., 2011).

A serious complication in system operation was the significant variation in daily incident mean radiation, which varied from  $\sim 120 \text{ W/m}^2$  in winter to  $\sim 320 \text{ W/m}^2$  in summer. This required specific adaptations in reactor management or system flows to enable effective water treatment in all seasons. In this study, the PBR HRT was governed by the TN concentration in the effluent. For a PBR treating  $1 \text{ m}^3 \cdot \text{day}^{-1}$  of wastewater, a PBR volume of approximately  $3.7 \text{ m}^3$  would be needed (see Eq. S6).

An additional challenge for microalgal cultivation in a desert climate is the high energy cost of cooling the water in the PBR systems during summer (or heating it during winter). One peculiar advantage of the microalgal growth scheme used in this study was the cooling system, which was based on heat exchange using a below-ground reservoir as a temperature buffer (Fig. 1), and the cultivation of strains isolated in Israel. During two cycles measured in summer at an average ambient temperature of  $26.7 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$  (daily minimum of  $19.8 \text{ }^\circ\text{C}$  and maximum of  $35.0 \text{ }^\circ\text{C}$ ), the average temperature in the PBR column was  $28.8 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$  (daily minimum of  $22.4 \text{ }^\circ\text{C}$  and maximum of  $35.4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) and was very similar to the average temperature in the below-ground reservoir ( $30.3 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ ). On average, pumping was only required for approximately 2 h per day for cooling at noon during summer, and  $< 60 \text{ min}$  per day for heating during winter (to keep early morning temperatures above  $10 \text{ }^\circ\text{C}$ ). This thermoregulation system also maintained low evaporation rates ( $< 15\%$  of the treated water volume), including water evaporating from the cooling tank.

### 3.4. System performance and perspective

The combination of AnMBR and microalgae as a post-treatment for food processing wastewater successfully produced high-quality low nutrient effluent and high resource recovery. One of the reasons for the efficiency of the algal cultivation was the high quality of the AnMBR effluent. Microscopy of the microalgae taken during the summer growth season (Fig. S7) demonstrated that the microalgal cultures remained essentially free of fungal and protist contamination, and had very low bacterial contamination, which is also beneficial for commercial biomass applications (Luo et al., 2017).

In light of the C recycling and stoichiometric constraints determined here, an appropriate operational scenario would be to use the biogas as the energy source on-site and to provide heat when required. In this way, most of the C would cycle through the system either as HTC or in algal biomass, avoiding most greenhouse gas emissions as a result of the waste treatment process. The success of such a process depends on reasonable C:N:P ratios in the wastewater, which match the biomass composition of the resulting algal biomass (Su, 2021). Fortunately, because of the similarity of the organics in the wastewater and the elemental composition of the microalgae, this condition was achieved here.

The proposed system did not reach its theoretical optimum performance (biomass growth and nutrient uptake) in all seasons, as demonstrated by the relatively poor performance in spring, which was apparently caused by an inadequate P/N ratio in the AnMBR effluent. This illustrates that outdoor microalgal wastewater treatment systems require online monitoring and possible adjustment of key limiting elements to enhance and balance the annual system performance (González-Camejo et al., 2019b). Another variable enabling system cost optimization is the choice of strains, to maximize valorization of the resulting microalgal biomass. For example, *Coelastrella* was found to produce high-value astaxanthin when exposed to extended nutrient starvation under specific conditions (Pancha et al., 2014). Ultimately, detailed environmental and economic assessments, as well as site-specific market and other cost or system-relevant details, will have to be considered to achieve a continuously operating zero-emission low-cost system, which is an issue dependent on the metabolic plasticity and stress tolerance of the microalgal species involved. Development of a realistically-scaled pilot operation will be required to enable the necessary environmental and economic optimizations, and market evaluation.

## 4. Conclusions

This study demonstrated a near-zero waste discharge scheme for treating food processing WWT using AnMBR, hydrothermal carbonization, and microalgae cultivation. AnMBR produced a low C and high-nutrients stream while maintaining low fouling. The high C content of the wastewater was largely recovered as biogas ( $\sim 70\%$ , out of which 57% methane), dissolved in the effluent ( $\sim 25\%$ ) which is still an untapped source, and as sludge ( $\sim 5\%$ ) that was treated using HTC for additional energy and nutrients recovery. The mass balance analysis also demonstrated near-complete nutrient recovery into algae biomass with recovery of N ( $\sim 77\%$ ) and P ( $\sim 91\%$ ). An effluent quality appropriate for reuse in irrigation was attained in 2.5 and 4.5 days in summer and winter, respectively. In summary, the technology demonstrated here recovered most wastewater-bound resources into algae biomass, hydrochar, and treated water in a near emission-free process and provides a paradigm for future successful high impact circular bioeconomic approaches.

### CRedit authorship contribution statement

**Amit Dan Grossman:** Investigation, Writing – original draft, Visualization. **Yonas Zeslase Belete:** Investigation, Writing – original draft. **Sammy Boussiba:** Conceptualization, Validation, Writing – review & editing. **Uri Yogev:** Validation, Formal analysis & Data curation. **Clemens Posten:** Conceptualization, Validation, Writing – review & editing. **Franziska Oritz Tena:** Validation, Writing – original draft, Visualization. **Laurenz Thomsen:** Conceptualization, Validation, Writing – review & editing. **Song Wang:** Validation, Writing – review & editing. **Amit Gross:** Conceptualization, Validation, Writing – review & editing, Supervision. **Stefan Leu:** Conceptualization, Investigation, Writing – review & editing, Supervision, Project administration. **Roy Bernstein:** Conceptualization, Validation, Writing – review & editing, Supervision, Project administration.

## Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Acknowledgments

This work was supported by grants from the Israeli Ministry of Science and Technology, and the German Federal Ministry of Education and Research: The German–Israeli Water Technology Cooperation Program (WT1605/02WIL1455A). A.D.G. and Y.B. acknowledge the Kreitman Negev Scholarship for Distinguished Ph.D. Students (Ben-Gurion University) for providing a graduate scholarship. The authors are thankful for Strauss – Frito-Lay for their collaboration during this study and also thank Tali Coves for technical support.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146373>.

## References

- APHA, 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, American Public Health Association. 21st ed. Standard Methods, Washington DC.
- APHA, 2017. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association (APHA).
- de Assis, T.C., Calijuri, M.L., Assemany, P.P., de Pereira, A.S.A., Martins, M.A., 2019. Using atmospheric emissions as CO<sub>2</sub> source in the cultivation of microalgae: productivity and economic viability. *J. Clean. Prod.* 215, 1160–1169.
- ASTM-D3176, 2015. Standard practice for ultimate analysis of coal and coke. *Annu. B. ASTM Stand.* 1–4.
- Baral, S.S., Dionisi, D., Maarisetty, D., Gandhi, A., Kothari, A., Gupta, G., Jain, P., 2020. Biofuel production potential from wastewater in India by integrating anaerobic membrane reactor with algal photobioreactor. *Biomass Bioenergy* 133, 105445.
- Batstone, D.J., Hülsen, T., Mehta, C.M., Keller, J., 2015. Platforms for energy and nutrient recovery from domestic wastewater: a review. *Chemosphere* 140, 2–11.
- Belete, Y.Z., Leu, S., Boussiba, S., Zorin, B., Posten, C., Thomsen, L., Wang, S., Gross, A., Bernstein, R., 2019. Characterization and utilization of hydrothermal carbonization aqueous phase as nutrient source for microalgal growth. *Bioresour. Technol.* 290, 121758.
- Belete, Y.Z., Ziemann, E., Gross, A., Bernstein, R., 2020. Facile activation of sludge-based hydrochar by Fenton oxidation for ammonium adsorption in aqueous media. *Chemosphere* 128526.
- Cai, T., Park, S.Y., Li, Y., 2013. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 19, 360–369.
- Cashman, S., Ma, X., Mosley, J., Garland, J., Crone, B., Xue, X., 2018. Energy and greenhouse gas life cycle assessment and cost analysis of aerobic and anaerobic membrane bioreactor systems: influence of scale, population density, climate, and methane recovery. *Bioresour. Technol.* 254, 56–66.
- Chu, H.-Q., Tan, X.-B., Zhang, Y.-L., Yang, L.-B., Zhao, F.-C., Guo, J., 2015. Continuous cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* using anaerobic digested starch processing wastewater in the outdoors. *Bioresour. Technol.* 185, 40–48.
- Dereli, R.K., Ersahin, M.E., Ozgun, H., Ozturk, I., Jeison, D., Van Der Zee, F., van Lier, J.B., 2012. Potentials of anaerobic membrane bioreactors to overcome treatment limitations induced by industrial wastewaters. *Bioresour. Technol.* 122, 160–170.
- Diez, V., Ezquerro, D., Cabezas, J.L., García, A., Ramos, C., 2014. A modified method for evaluation of critical flux, fouling rate and in situ determination of resistance and compressibility in MBR under different fouling conditions. *J. Memb. Sci.* 453, 1–11.
- D'Imporzano, G., Veronesi, D., Salati, S., Adani, F., 2018. Carbon and nutrient recovery in the cultivation of *Chlorella vulgaris*: a life cycle assessment approach to comparing environmental performance. *J. Clean. Prod.* 194, 685–694.
- Ferreira, A., Ribeiro, B., Marques, P.A.S.S., Ferreira, A.F., Dias, A.P., Pinheiro, H.M., Reis, A., Gouveia, L., 2017. Scenedesmus obliquus mediated brewery wastewater remediation and CO<sub>2</sub> biofixation for green energy purposes. *J. Clean. Prod.* 165, 1316–1327.
- Ferro, L., Gorzsás, A., Gentili, F.G., Funk, C., 2018. Subarctic microalgal strains treat wastewater and produce biomass at low temperature and short photoperiod. *Algal Res.* 35, 160–167.
- Galib, M., Elbeshbishy, E., Reid, R., Hussain, A., Lee, H.-S., 2016. Energy-positive food wastewater treatment using an anaerobic membrane bioreactor (AnMBR). *J. Environ. Manag.* 182, 477–485.
- Gaur, R.Z., Khoury, O., Zohar, M., Poverenov, E., Darzi, R., Laor, Y., Posmanik, R., 2020. Hydrothermal carbonization of sewage sludge coupled with anaerobic digestion: integrated approach for sludge management and energy recycling. *Energy Convers. Manag.* 224, 113353.
- González-Camejo, J., Serna-García, R., Viruela, A., Pachés, M., Durán, F., Robles, A., Ruano, M.V., Barat, R., Seco, A., 2017. Short and long-term experiments on the effect of sulphide on microalgae cultivation in tertiary sewage treatment. *Bioresour. Technol.* 244, 15–22.
- González-Camejo, J., Aparicio, S., Ruano, M.V., Borrás, L., Barat, R., Ferrer, J., 2019a. Effect of ambient temperature variations on an indigenous microalgae-nitrifying bacteria culture dominated by *Chlorella*. *Bioresour. Technol.* 290, 121788.
- González-Camejo, J., Viruela, A., Ruano, M.V., Barat, R., Seco, A., Ferrer, J., 2019b. Effect of light intensity, light duration and photoperiods in the performance of an outdoor photobioreactor for urban wastewater treatment. *Algal Res.* 40, 101511.
- González-Camejo, J., Barat, R., Aguado, D., Ferrer, J., 2020. Continuous 3-year outdoor operation of a flat-panel membrane photobioreactor to treat effluent from an anaerobic membrane bioreactor. *Water Res.* 169, 115238.
- Grossman, A.D., Yang, Y., Yogev, U., Camarena, D.C., Oron, G., Bernstein, R., 2019. Effect of ultrafiltration membrane material on fouling dynamics in a submerged anaerobic membrane bioreactor treating domestic wastewater. *Environ. Sci. Water Res. Technol.* 5, 1145–1156.
- Han, J., Thomsen, L., Pan, K., Wang, P., Wawilow, T., Osundeko, O., Wang, S., Theilen, U., Thomsen, C., 2019. Treating wastewater by indigenous microalgae strain in pilot platform located inside a municipal wastewater treatment plant. *Environ. Technol. (United Kingdom)* 3330.
- Handler, R.M., Canter, C.E., Kalnes, T.N., Lupton, F.S., Kholiqov, O., Shonnard, D.R., Blowers, P., 2012. Evaluation of environmental impacts from microalgae cultivation in open-air raceway ponds: analysis of the prior literature and investigation of wide variance in predicted impacts. *Algal Res.* 1, 83–92.
- Hulatt, C.J., Thomas, D.N., 2011. Energy efficiency of an outdoor microalgal photobioreactor sited at mid-temperate latitude. *Bioresour. Technol.* 102, 6687–6695.
- Hunter, R.G., Day, J.W., Wiegman, A.R., Lane, R.R., 2019. Municipal wastewater treatment costs with an emphasis on assimilation wetlands in the Louisiana coastal zone. *Ecol. Eng.* 137, 21–25.
- Inbar, Y., 2007. New standards for treated wastewater reuse in Israel. Springer, pp. 291–296.
- Khoo, C.G., Dasan, Y.K., Lam, M.K., Lee, K.T., 2019. Algae biorefinery: review on a broad spectrum of downstream processes and products. *Bioresour. Technol.* 292, 121964.
- Koller, M., Salerno, A., Tuffner, P., Koinigg, M., Böchzelt, H., Schober, S., Pieber, S., Schnitzer, H., Mittelbach, M., Brauneegg, G., 2012. Characteristics and potential of micro algal cultivation strategies: a review. *J. Clean. Prod.* 37, 377–388.
- Li, K., Liu, Q., Fang, F., Luo, R., Lu, Q., Zhou, W., Huo, S., Cheng, P., Liu, J., Addy, M., Chen, P., Chen, D., Ruan, R., 2019a. Microalgae-based wastewater treatment for nutrients recovery: a review. *Bioresour. Technol.* 291, 121934.
- Li, Y., Slouka, S.A., Henkanatte-Gedera, S.M., Nirmalakhandan, N., Strathmann, T.J., 2019b. Seasonal treatment and economic evaluation of an algal wastewater system for energy and nutrient recovery. *Environ. Sci. Water Res. Technol.* 5, 1545–1557.
- Li, N., Wan, Y., Wang, X., 2020. Nutrient conversion and recovery from wastewater using electroactive bacteria. *Sci. Total Environ.* 706, 135690.
- López Barreiro, D., Bauer, M., Hornung, U., Posten, C., Kruse, A., Prins, W., 2015. Cultivation of microalgae with recovered nutrients after hydrothermal liquefaction. *Algal Res.* 9, 99–106.
- Luo, Y., Le-Clech, P., Henderson, R.K., 2017. Simultaneous microalgae cultivation and wastewater treatment in submerged membrane photobioreactors: a review. *Algal Res.* 24, 425–437.
- Maaz, M., Yasin, M., Aslam, M., Kumar, G., Atabani, A.E., Idrees, M., Anjum, F., Jamil, F., Ahmad, R., Khan, A.L., Lesage, G., Heran, M., Kim, J., 2019. Anaerobic membrane bioreactors for wastewater treatment: novel configurations, fouling control and energy considerations. *Bioresour. Technol.* 283, 358–372.
- Maktabifard, M., Zaborowska, E., Makinia, J., 2020. Energy neutrality versus carbon footprint minimization in municipal wastewater treatment plants. *Bioresour. Technol.* 300, 122647.
- Manninen, K., Huttunen, S., Seppälä, J., Laitinen, J., Spilling, K., 2016. Resource recycling with algal cultivation: environmental and social perspectives. *J. Clean. Prod.* 134, 495–505.
- Mau, V., Neumann, J., Wehrli, B., Gross, A., 2019. Nutrient behavior in hydrothermal carbonization aqueous phase following recirculation and reuse. *Environ. Sci. Technol.* 53, 10426–10434.
- Mohsenpour, S.F., Hennige, S., Willoughby, N., Adeloje, A., Gutierrez, T., 2021. Integrating micro-algae into wastewater treatment: a review. *Sci. Total Environ.* 752, 142168.
- Nagarajan, D., Lee, D.J., Chen, C.Y., Chang, J.S., 2020. Resource recovery from wastewaters using microalgae-based approaches: a circular bioeconomy perspective. *Bioresour. Technol.* 302, 122817.
- Norsker, N.H., Barbosa, M.J., Vermuë, M.H., Wijffels, R.H., 2011. Microalgal production - a close look at the economics. *Biotechnol. Adv.* 29, 24–27.
- Nwoba, E.G., Ayre, J.M., Moheimani, N.R., Ubi, B.E., Ogbonna, J.C., 2016. Growth comparison of microalgae in tubular photobioreactor and open pond for treating anaerobic digestion piggery effluent. *Algal Res.* 17, 268–276.
- Pancha, I., Chokshi, K., George, B., Ghosh, T., Paliwal, C., Maurya, R., Mishra, S., 2014. Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresour. Technol.* 156, 146–154.
- Power, S.D., Jones, C.L.W., 2016. Anaerobically digested brewery effluent as a medium for hydroponic crop production – the influence of algal ponds and pH. *J. Clean. Prod.* 139, 167–174.
- Prete, R., Robles, A., Ruano, M. V., Seco, A., Ferrer, J., 2016. Economic and environmental sustainability of submerged anaerobic MBR-based (AnMBR-based) technology as compared to aerobic-based technologies for moderate-/high-loaded urban wastewater treatment. *J. Environ. Manag.* 166, 45–54.
- Robles, Á., Aguado, D., Barat, R., Borrás, L., Bouzas, A., Giménez, J.B., Martí, N., Ribes, J., Ruano, M.V., Serralla, J., Ferrer, J., Seco, A., 2020a. New frontiers from removal to

- recycling of nitrogen and phosphorus from wastewater in the circular economy. *Bioresour. Technol.* 300, 122673.
- Robles, Á., Durán, F., Giménez, J.B., Jiménez, E., Ribes, J., Serralta, J., Seco, A., Ferrer, J., Rogalla, F., 2020b. Anaerobic membrane bioreactors (AnMBR) treating urban wastewater in mild climates. *Bioresour. Technol.* 314, 123763.
- Shilton, N.B.A., 2014. Luxury uptake of phosphorus by microalgae in waste stabilisation ponds: current understanding and future direction. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology* 321–328.
- Smith, A.L., Stadler, L.B., Love, N.G., Skerlos, S.J., Raskin, L., 2012. Perspectives on anaerobic membrane bioreactor treatment of domestic wastewater: a critical review. *Bioresour. Technol.* 122, 149–159.
- Smith, A.L., Stadler, L.B., Cao, L., Love, N.G., Raskin, L., Skerlos, S.J., 2014. Navigating wastewater energy recovery strategies: a life cycle comparison of anaerobic membrane bioreactor and conventional treatment systems with anaerobic digestion. *Environ. Sci. Technol.* 48, 5972–5981.
- Song, C., Hu, X., Liu, Z., Li, S., Kitamura, Y., 2020. Combination of brewery wastewater purification and CO<sub>2</sub> fixation with potential value-added ingredients production via different microalgae strains cultivation. *J. Clean. Prod.* 268, 122332.
- Su, Y., 2021. Revisiting carbon, nitrogen, and phosphorus metabolisms in microalgae for wastewater treatment. *Sci. Total Environ.* 762, 144590.
- Tee, P.F., Abdullah, M.O., Tan, I.A.W., Rashid, N.K.A., Amin, M.A.M., Nolasco-Hipolito, C., Bujang, K., 2016. Review on hybrid energy systems for wastewater treatment and bio-energy production. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 54, 235–246.
- van Hue, N., Evans, C.E., 1986. *Procedures Used for Soil and Plant Analysis* University Soil Testing Laboratory.
- Viruela, A., Robles, Á., Durán, F., Ruano, M.V., Barat, R., Ferrer, J., Seco, A., 2018. Performance of an outdoor membrane photobioreactor for resource recovery from anaerobically treated sewage. *J. Clean. Prod.* 178, 665–674.
- Vu, M.T., Vu, H.P., Nguyen, L.N., Semblante, G.U., Johir, M.A.H., Nghiem, L.D., 2020. A hybrid anaerobic and microalgal membrane reactor for energy and microalgal biomass production from wastewater. *Environ. Technol. Innov.* 19, 100834.
- Yadav, G., Meena, D.K., Sahoo, A.K., Das, B.K., Sen, R., 2020. Effective valorization of microalgal biomass for the production of nutritional fish-feed supplements. *J. Clean. Prod.* 243, 118697.

## 7.2 Characterization of an aerated submerged hollow fiber ultrafiltration device for efficient microalgae harvesting

**DOI:** 10.1002/elsc.202100052

**Journal:** Engineering in Life Sciences, 2021, Volume 21, Issue 10, Seiten 607 - 622

**Autoren:** Franziska Ortiz Tena, Karolína Ranglová, David Kubač, Christian Steinweg, Claudia Thomsen, Jiří Masojidek, Clemens Posten

### Zusammenfassung

Die vorliegende Veröffentlichung beschreibt eine Ultrafiltrationseinheit (*Harvester*) zur Filtration von Mikroalgensuspensionen, welche ein getauchtes, belüftetes Membranmodul aus Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Hohlfasern enthält ( $0,03 \mu\text{m}$ ). Kommerzielle Bäckerhefe diente als Modellsuspension, um den Einfluss der Belüftungsrate der Hohlfasern auf den kritischen Fluss ( $CF$ ,  $J_c$ ) für verschiedene Zellkonzentrationen zu untersuchen. Es wurde eine optimale Belüftungsrate von  $1,25 \text{ vvm}$  ermittelt. Außerdem wurde der  $CF$  zweier *Chlorella*-Kulturen (axenisch und nicht-axenisch) unterschiedlicher Biomassedichten ( $0,8\text{-}17,5 \text{ g}_{\text{BTM}}\cdot\text{L}^{-1}$ ) bestimmt. Vergleichbar hohe kritische Fluxe von  $15,57$  und  $10,08 \text{ L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  wurden für Mikroalgenkonzentrationen von  $4,8$  bzw.  $10,0 \text{ g}_{\text{BTM}}\cdot\text{L}^{-1}$  gemessen, wobei eine sehr strikte Definition des  $J_c$  angewandt wurde. Außerdem korrelierten die  $J_c$ -Werte (negativ) linear mit der Biomassekonzentration ( $0,8\text{-}10,0 \text{ g}_{\text{BTM}}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Bei der Kurzzeitfiltration von Mikroalgensuspensionen unterschiedlicher Biomassedichten wurden Konzentrationsfaktoren zwischen  $2,8$  und  $12,4$  und volumetrische Reduktionsfaktoren zwischen  $3,5$  und  $11,5$  erreicht, wobei eine stabile Filtration bei Biomassekonzentrationen bis zu  $40,0 \text{ g}_{\text{BTM}}\cdot\text{L}^{-1}$  möglich war. Maßnahmen zur Fouling-Kontrolle (Belüftung der Membranfasern, periodisches Rückspülen) konnten erfolgreich angewandt werden. Eine Berechnung des Energieverbrauchs des *Harvesters* ergab einen sehr geringen Energiebedarf für eine Aufkonzentrierung von  $2$  auf  $40 \text{ g}_{\text{BTM}}\cdot\text{L}^{-1}$  einer Mikroalgensuspension von  $17,97 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-3}$  behandelte Ausgangssuspension ( $4,99 \cdot 10^{-3} \text{ kWh}\cdot\text{m}^{-3}$ ) bzw.  $37,83 \text{ kJ}\cdot\text{kg}^{-3}$  abgetrennter Biomasse ( $1,05 \cdot 10^{-2} \text{ kWh}\cdot\text{kg}^{-1}$ ).

## RESEARCH ARTICLE

# Characterization of an aerated submerged hollow fiber ultrafiltration device for efficient microalgae harvesting

Franziska Ortiz Tena<sup>1</sup>  | Karolína Ranglová<sup>2</sup> | David Kubač<sup>2</sup> |  
Christian Steinweg<sup>1</sup> | Claudia Thomson<sup>3</sup> | Jiří Masojidek<sup>2,4</sup> | Clemens Posten<sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Institute of Process Engineering in Life Sciences Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Karlsruhe, Germany

<sup>2</sup> Laboratory of Algal Biotechnology, Centre Algatech, Czech Academy of Science, Institute of Microbiology, Třeboň, Czech Republic

<sup>3</sup> iSeaMC GmbH, Bremen, Germany

<sup>4</sup> Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

## Correspondence

Franziska Ortiz Tena, Institute of Process Engineering in Life Sciences, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Fritz Haber Weg 2, 76131 Karlsruhe, Germany.  
Email: [franziska.ortiz-tena@kit.edu](mailto:franziska.ortiz-tena@kit.edu)

## Funding information

Horizon 2020 Framework Programme, Grant/Award Number: Sabana 727874

## Abstract

The present work characterizes a submerged aerated hollow fiber polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (0.03  $\mu\text{m}$ ) device (*Harvester*) designed for the ultrafiltration (UF) of microalgae suspensions. Commercial baker's yeast served as model suspension to investigate the influence of the aeration rate of the hollow fibers on the critical flux (CF,  $J_c$ ) for different cell concentrations. An optimal aeration rate of 1.25 vvm was determined. Moreover, the CF was evaluated using two different *Chlorella* cultures (axenic and non-axenic) of various biomass densities (0.8–17.5 g DW/L). Comparably high CFs of 15.57 and 10.08 L/m<sup>2</sup>/h were measured for microalgae concentrations of 4.8 and 10.0 g DW/L, respectively, applying very strict CF criteria. Furthermore, the  $J_c$ -values correlated (negative) linearly with the biomass concentration (0.8–10.0 g DW/L). Concentration factors between 2.8 and 12.4 and volumetric reduction factors varying from 3.5 to 11.5 could be achieved in short-term filtration, whereat a stable filtration handling biomass concentrations up to 40.0 g DW/L was feasible. Measures for fouling control (aeration of membrane fibers, periodic backflushing) have thus been proven to be successful. Estimations on energy consumption revealed very low energy demand of 17.97 kJ/m<sup>3</sup> treated microalgae feed suspension ( $4.99 \times 10^{-3}$  kWh/m<sup>3</sup>) and 37.83 kJ/kg treated biomass ( $1.05 \times 10^{-2}$  kWh/kg), respectively, for an up-concentration from 2 to 40 g DW/L of a microalgae suspension.

## KEYWORDS

energy, filtration, harvesting, membrane, microalgae

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2021 The Authors. *Engineering in Life Sciences* published by Wiley-VCH GmbH

## 1 | INTRODUCTION

The term *microalgae* usually refers to photosynthetic microorganisms, both prokaryotic and eukaryotic, forming single cells, filaments, or aggregates. A great variety of species has been discovered to date, revealing various biochemical compounds and possible applications [1]. The fields of food and feed application, wastewater treatment, biofuel, or fertilizer production are just some examples for possible microalgae utilization [2]. As a consequence, dewatering of microalgae is gaining more and more interest as an important part of downstream processing. Cultivating microalgae biomass in outdoor units usually results in dilute suspensions with low biomass densities (measured as dry weight [DW]) of about 1–3 g DW/L (assuming a water content of 90% in the cells this means 10 g/L “solids” correspond to 1–3% w/w total solids [TS]). These values are more than 10 times lower than those achieved in classic heterotrophic cultivation processes. The separation of water from biomass, especially of small single-celled microalgae strains, thus requires costly processing of large water volumes, representing one of the major challenges of microalgae downstream processing [3–5].

The majority of microalgae cells are characterized by their small size (range of 1–10  $\mu\text{m}$  [6]) and cell density similar to water (marine algae: 1030–1100  $\text{kg}/\text{m}^3$ , freshwater algae: 1040–1140  $\text{kg}/\text{m}^3$  [7]), both resulting in slow settling velocities according to Stokes' law [8–10]. In some cases, high lipid content in the cells and high salt content in the medium can even reduce density difference to zero. These cell properties make especially centrifugation rather inefficient. However, even though it is cost and energy demanding, centrifugation is the most commonly used method for harvesting large volumes [4, 5]. It is suitable for most types of microalgae—except fragile species—but mainly applied when high-value products are required. Disk stack centrifuges (like for yeasts) offering very small sedimentation paths are the device of choice, furthermore special designs have been developed for microalgae harvesting (see a recent review [11]). Filtration—as the major alternative—has its drawbacks as well. The small cell size makes an even thin filter cake in dead-end filtration practically impermeable. Elasticity of the outer layer of microalgal cells can block the gussets between the particles leading to a so-called compressible filter cake. In such cases, higher transmembrane pressure (TMP) increases the filter cake resistance but not the flow. Frequently occurring suspended macromolecules make employment of alternative approaches with active filter cake or clogging removal necessary. These could be crossflow filtration, for example,

### PRACTICAL APPLICATION

A ready built filtration unit is presented to be employed for large-scale microalgae cultivation. It is especially foreseen for low energy cell recycle and biomass preconcentration. This saves 90% of water throughput in a subsequent centrifugation step. The presented *Harvester* offers a robust, practical, and low energy suspension toward an energetically feasible microalgae production.

in the construction form of dynamic crossflow filtration [4, 12]. The use of filter aids like in yeast filtration is not applicable. At the end, the produced slurries may contain still too much water for subsequent processing steps. Preconcentration steps like floatation or flocculation (per flocculants or auto-flocculation per pH-shifts) are only applicable in medium scale. For the purpose of feed and food additives, wastewater treatment, pharmaceuticals, and bioactive compound production, the application of contaminating substances (like coagulants) that ease the harvesting process is not allowed [3, 4, 9].

Due to these obstacles, dewatering of microalgae can be technology, energy and cost demanding [10] and can make 20–30% of the biomass production costs [3]. At present, microalgae processing requires a high net energy ratio (energy required to produce dry biomass [DBM] vs. energy content) and carbon balance reducing the application of microalgae biomass mostly to high-value products ( $> \$10,000 \text{ t}^{-1}$ ) [9]. To be able to set up an economically viable and environmentally sustainable microalgae process, a low-energy harvesting method is therefore required. Most important, microalgae dewatering processes should be highly effective for most of all microalgae strains generating high biomass concentrations at its recovery. Besides, operation, energy and maintenance costs need to be moderate while handling of large volumes is possible.

Up to now, no universal harvesting technique has been found that meets all requirements. To decrease harvesting costs, dewatering processes are often set up as two step concentration procedures: first step—preconcentration (thickening) and the second step—dewatering. Often, a typical microalgae harvesting process combines membrane filtration followed by centrifugation. Usually, the microalgae slurry is thickened during the first step to 2–7% total suspended solids (TSS) before it is dewatered to a “cake” (paste) of 25% TSS (concentration factor up

to 10) [3, 8]. This procedure combines membrane filtration as a low energy step for high water throughput and a high energy centrifugation step to achieve high product concentrations. Preconcentration of, for example, a factor 10 from 3 to 30 g/L and a subsequent centrifugation step from 30 to 300 g/L reduces energy demand in the centrifuge by about 90% compared to centrifugation alone.

Especially in wastewater treatment by microalgae additional tasks have to be accomplished. Low light conditions can lead to low growth rates where the cells cannot take up all nutrients. On the other hand, low biomass concentrations caused by low nutrient availability lead to inefficient light usage. Together with the typical not controllable continuous flow, this requires a controllable biomass recycle or retention. If possible, this should be done with the same filtration device as the preconcentration step. Membrane filtration is—especially for the first concentration step—a dewatering method for microalgae biomass that has several advantages. It is suitable for diluted suspensions with initial concentrations  $\leq 10$  wt./vol.% and can yield up to 40% TSS with a microalgae removal of more than 95%. Furthermore, cell damage is minimal due to reduced shear stress, making this generally low-energy technology also ideal for shear sensitive species. Nevertheless, membrane fouling is the major drawback of this rather slow microalgae harvesting method. Periodic membrane cleaning and/or replacement can increase process costs and reduce the overall process efficiency [3, 8, 9]. It was shown, that energy demand of the two-step process (first step: membrane filtration, second step: centrifugation) can be effectively reduced by up to 90.4% per  $\text{m}^3$  and 96.9% per kg harvested biomass, respectively [13].

In this work, a prototype of a low-energy, submerged, aerated hollow fiber membrane filtration unit designed for microalgae harvesting was developed and characterized. The so-called *Harvester* has been designed to process microalgae cultures of low biomass densities, which should be effectively concentrated. Membrane fouling is minimized by periodic backflushing and due to air bubbling inducing moderate shear on the membrane surface to minimize a cake build-up and pore blocking. Several variables were evaluated in this study to characterize the membrane performance: membrane permeability and compressibility, critical fluxes (CFs) for various biomass concentrations of unicellular microalgae *Chlorella*. A model organism (yeast *Saccharomyces cerevisiae*) served as control to differentiate between biological and procedural effects.

The *Harvester* described in this study can be regarded as a way to solve the problem of high energy costs of microalgae dewatering during biomass downstream processing.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Microalgae cultivation and biomass preparation

#### 2.1.1 | Microalgae

Two different *Chlorella* microalgae strains (both cultivated phototrophically) with a cell size between 2 and 10  $\mu\text{m}$  were used for the determination of the CF (see Section 2.3).

*Chlorella vulgaris* H14 (further abbreviated as *Chlorella* A) was cultivated axenically in TAP-Medium (acetate-free, pH 7.5) in a closed 28 L photobioreactor (pH 7, 5, 25°C, 1.1 vvm, 1%  $\text{CO}_2$ ) with internal lightening and light intensities up to 500  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{h}$ .

The microalgae *C. vulgaris* R-117 (CCALA 1107, Culture Collection of Autotrophic Organisms, Institute of Botany, Třeboň, Czech Republic; further abbreviated as *Chlorella* B) was cultivated non-axenically in inorganic medium [14–17] during July 2020 at Centre Algatech, Třeboň (GPS coordinates – 48°59'15" N; 14°46'40.630" E) using an outdoor thin-layer cascade (650 L). Automatic regulation of  $\text{CO}_2$  supply kept pH at  $8.0 \pm 0.2$ .

#### 2.1.2 | Yeast

Commercial baker's yeast *S. cerevisiae* (DHW, Vital Gold) was used as a model organism of a spherical cell shape with diameter of 5–10  $\mu\text{m}$  similar to most microalgae species. The yeast experiments allowed defining a preliminary range of operation for the characterization of the filtration device using a microalgae biomass.

The yeast material was dissolved in phosphate-buffered saline medium (PBS, NaCl 8 g/L, KCl 0.2 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.44 g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.24 g/L, pH 7.4), a non-toxic buffer for cells that protects the cells from osmotic pressure. For CF experiments, two yeast suspensions of different biomass densities of 3.0 and 15.0 g DW/L were used.

### 2.2 | Biomass quantification

Biomass density was determined by measurement of the optical density (OD) of microalgae and yeast at 750 and 500 nm, respectively, using a VIS-spectrophotometer (V-1200, VWR/Perkin Elmer, Lambda 35).

The measurement of DBM concentration (in g DW per L) was performed as previously described [17–19]. Culture samples (5 mL) were collected on preweighed glass microfiber filters (GC-50). The cells were washed twice with deionized (DI) water, the filters were dried in an oven

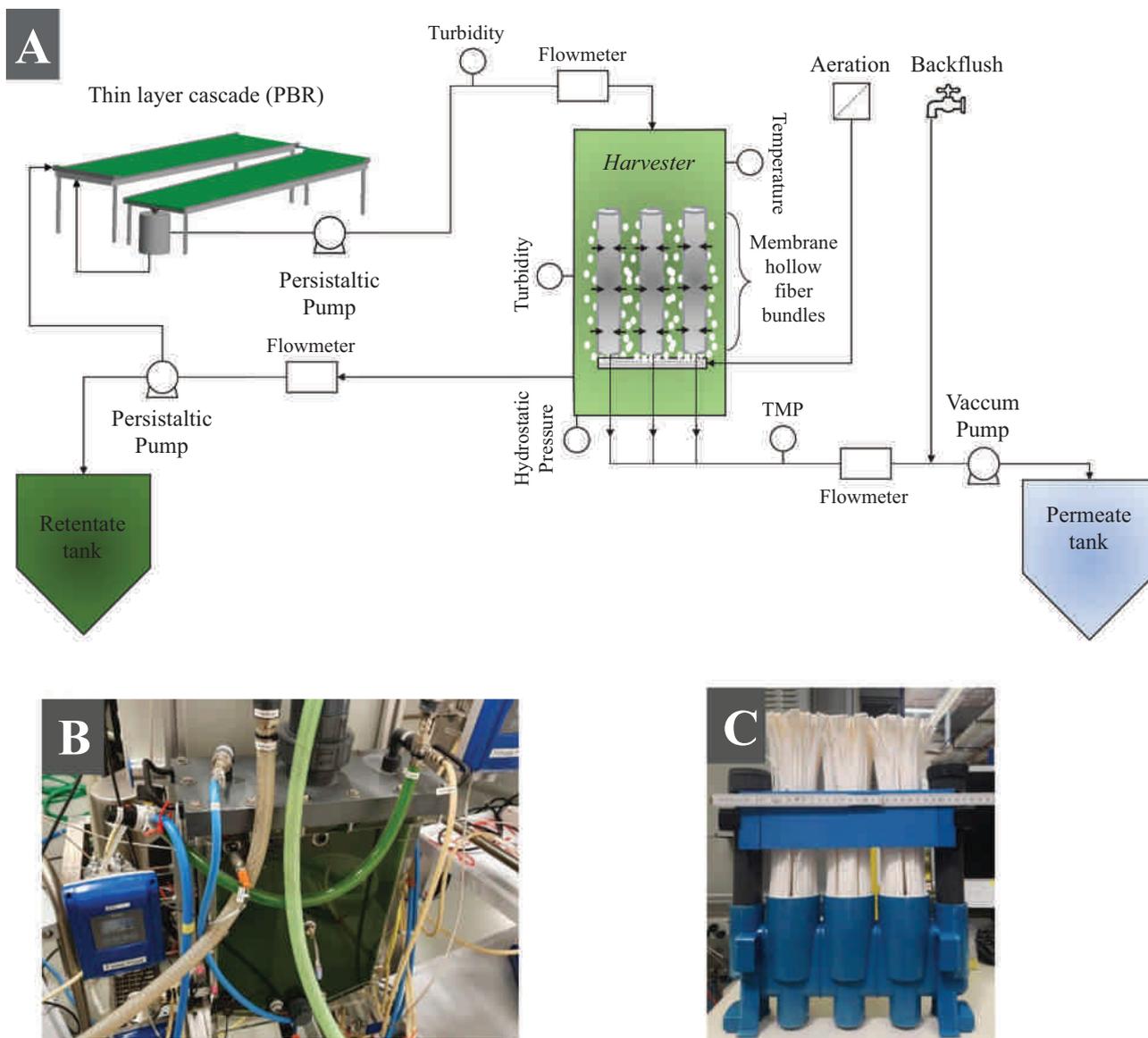


FIGURE 1 (A) Experimental set-up of the ultrafiltration device *Harvester*, (B) process of microalgae filtration, (C) membrane module Puron® Hollow Fiber Rows produced by Koch Membrane Systems

at 105°C for 8 h, and finally transferred to a desiccator and weighed (precision of  $\pm 0.01$  mg).

## 2.3 | Filtration device *Harvester*

### 2.3.1 | Description of the ultrafiltration device *Harvester*

For microalgae harvesting, a pilot-scale ultrafiltration (UF) device (*Harvester 1.0*, designated as *Harvester*) was designed and constructed (Figure 1). The commercially available membrane module (Puron Hollow Fiber Rows, Koch Membrane Systems) used in the *Harvester* consists of three bundles of aerated submerged polyvinylidene flu-

oride (PVDF) hollow fibers with a nominal pore size of  $0.03 \mu\text{m}$ , the total membrane surface of  $1.31 \text{ m}^2$  and a pure water permeability of about  $490 \text{ L/m}^2/\text{h}\cdot\text{bar}$  at  $22^\circ\text{C}$ . The permeate is collected on the inner side of the fibers (outside-in application). The fibers can be aerated using a controllable mass flow controller (Type 1579, mks) for fouling reduction. The driving force for the filtration process is a TMP, which is applied by a vacuum pump (Drive: MCP-Z Process ISM918A, Pump head: Z-201, MI0023, Ismatec) and monitored online using a pressure transmitter (MS – 10663, WIKA). Both constant flux and constant pressure are feasible to generate a permeate flux. A turbidity sensor (Turbimax CUS50D, Endress & Hauser) was used to measure the concentration of the cell-containing suspension online, fed to the *Harvester* using a peristaltic pump

**TABLE 1** Starting fluxes and flux-step heights for the CF experiments of various species and aeration rates

Microorganism	Starting flux $J_{\text{Start}}$	Flux-step height	
<i>S. cerevisiae</i>	9.16 L/m <sup>2</sup> /h	2.30 L/m <sup>2</sup> /h	(Aeration 0.00 and 1.25 vvm)
	13.75 L/m <sup>2</sup> /h	2.30 L/m <sup>2</sup> /h	(Aeration 2.50 vvm)
<i>Chlorella A</i>	10.30 L/m <sup>2</sup> /h	1.16 L/m <sup>2</sup> /h	(DBM 1.0 g DW/L)
	13.70 L/m <sup>2</sup> /h	2.30 L/m <sup>2</sup> /h	(DBM 0.8 g DW/L)
<i>Chlorella B</i>	9.16 L/m <sup>2</sup> /h	0.90 L/m <sup>2</sup> /h	(All biomass concentrations tested)

(Flowmaster FMT300 - ISM 1020, Ismatec) from a coupled photobioreactor (PBR in case of microalgae) or a feed tank (yeast). The concentrated cell suspension—retentate—can be pumped out of the *Harvester* via a peristaltic pump (Drive: Ecoline VC-Easy-Load - ISM 1077A, pump head: Masterflex L/S - 7518-10, Ismatec). Cell recycling to the cultivation unit as well as collection in a retentate tank is possible. All fluxes applied (feed, retentate, and permeate) were quantified online using flowmeters (Optiflux 5000, Krohne). The temperature (AT 001, autosen GmbH) and turbidity (Turbimax CUS50D, Endress & Hauser) inside the *Harvester* as well as its filling height (via hydrostatic pressure sensor (AC 004 Niveau, autosen GmbH)) were measured online. Periodic backflushing with tap water was applied to reduce membrane fouling.

### 2.3.2 | Membrane resistance

Prior to the filtration experiments, the membrane was conditioned filtering DI-water at a constant permeate flux for 45 min. The water-flux ( $J_w$  in L/m<sup>2</sup>/h) of the clean membrane was measured afterwards for a minimum of 10 min. The membrane resistance  $R_m$  of the clean membrane could be calculated using the applied TMP (in mbar) and temperature-dependent viscosity of water ( $\mu(T)$ ) in Pa s according to Equation (1) [20].

$$R_m = \frac{\text{TMP}}{J_w \cdot \mu(T)} \quad (1)$$

### 2.3.3 | Determination of the critical flux

The critical Flux  $J_c$  was described by Field et al. in 1995 [21] who stated a threshold flux—the so-called CF—below which fouling does not occur. To date, more classifications (e.g., strong/weak form of the CF) have been defined [22], but those will not be distinguished in this work. The term “critical flux” here refers to the maximum permeate flux, above which a measurable increase in pressure ( $d\text{TMP}/dt$ ) occurs at a constant pressure filtration.

Several methods for the measurement of the CF have been used [23]. In the present study, the method described

by Diez et al. [24] was applied. The “modified flux-step method” uses backflushing to remove fouling built-up during the individual flux steps. In each step, the constant flux was set up for a period of 10 min, within which the TMP was recorded. For evaluation of each interval, the pressure increase ( $d\text{TMP}/dt$ ) of each flux step was determined via linear regression. A critical TMP-increase of 10 Pa/min was chosen analogously to van der Marel et al. [25].

The starting flux and flux-step height for the various species tested are listed in Table 1. Only the ascending phase was taken into account, as both ascending and descending phases have been proven to identify the same value for the CF (data not shown).

### 2.3.4 | Evaluation of the filtration process

To evaluate the harvesting efficiency of the complete process, a volumetric reduction factor (VRF) as well as a concentration factor  $F_C$  were defined according to Equations (3) and (4) [26], using the initial ( $V_0$ ) and final ( $V_f$ ) volumes as well as the final ( $C_f$ ) and initial ( $C_0$ ) microalgae concentrations.

$$\text{VRF} = \frac{V_0}{V_f} \quad (2)$$

$$F_C = \frac{C_f}{C_0} \quad (3)$$

The harvesting efficiency ( $\eta$ ) was used to evaluate the quality of the permeate generated by the membrane. It refers to the decrease of the OD of the feed suspension ( $\text{OD}_{\text{feed}}$ ) due to biomass present the permeate ( $\text{OD}_{\text{permeate}}$ ) in percent. A value of 100% means a full retention of any solid particles by the membrane.

$$\eta = \frac{\text{OD}_{\text{feed}} - \text{OD}_{\text{permeate}}}{\text{OD}_{\text{feed}}} \quad (4)$$

### 2.3.5 | Mass balance for the *Harvester*

The filtration device *Harvester* can be used as a tool for the up-concentration of a microalgae culture. Furthermore, it

can be coupled to a photobioreactor to control the biomass concentration by cell recycling ( $R$ ) or discharge ( $D$ ). A mass balance for the *Harvester* revealed the following relation (Equation (5)):

$$c_{x,\text{retentate}} = \frac{\dot{V}_{\text{feed}}}{\dot{V}_{\text{retentate}}} \cdot c_{x,\text{feed}} \quad (5)$$

where  $\dot{V}_{\text{feed}}$  is the feed flux into the *Harvester* in L/min,  $c_{x,\text{feed}}$  is the biomass concentration (g DW/L) of the feed suspension,  $\dot{V}_{\text{retentate}}$  the retentate flux out the *Harvester*, and  $c_{x,\text{retentate}}$  the biomass concentration (g DW/L) of the retentate.

### 2.3.6 | Energy consumption

To evaluate the energy consumption of the filtration unit *Harvester*, the pumping of the feed suspension (feed pump), permeate (permeate pump) as well as the concentrated retentate stream (harvest pump), together with the energy needed for membrane aeration have to be considered. For various biomass concentrations (start/end), the VRFs, and concentration factors, the energy demand for different scenarios could be evaluated and compared. A theoretical set-up with a given feed flux of 100 m<sup>3</sup>/h, an aeration rate of the membrane fibers of 1.25 vvm, and an operational permeate flux set to a sub-critical value of 19.5 L/m<sup>2</sup>/h (representing 85% of the CF predetermined for representative biomass concentrations) were considered. Using the above-mentioned frame conditions, the energy required to perform a biomass concentration to a certain level per m<sup>3</sup> permeate ( $E_v$  in kJ/m<sup>3</sup> and kWh/m<sup>3</sup>) was calculated. Furthermore, the energy consumption per kg DW of the harvested biomass  $E_w$  (in kJ/kg and kWh/kg) could be determined.

The theoretical pumping power requirement ( $P_{\text{th,feed/retentate}}$ ) of the peristaltic feed and harvest pump was calculated using Equation (6) with  $\dot{V}$  is the corresponding flux (feed/retentate),  $\rho$  is the density of the suspension pumped (feed/retentate),  $g$  the gravity acceleration, and  $H$  is the pumping height.

$$P_{\text{th,feed/retentate}} = \dot{V} \cdot \rho \cdot g \cdot H \quad (6)$$

For the permeate pump,  $P_{\text{th,permeate}}$  was determined using Equation (7),  $\dot{V}$  being the permeate flux and  $\Delta p$  the pressure difference between both sides of the membrane counted positive from outside to inside of the fibers.

$$P_{\text{th,permeate}} = \dot{V} \cdot \Delta p \quad (7)$$

**TABLE 2**  $J_c$  and CF criterion  $d\text{TMP}/dt$  of a yeast suspension (*S. cerevisiae*) for various biomass concentrations (3.0 and 15.0 g DW/L) and various aeration rates of membrane fibers of 0.00, 1.25, and 2.50 vvm

Biomass concentration (g DW/L)	Aeration (vvm)	$J_c$ (L/m <sup>2</sup> /h)	$d\text{TMP}/dt$ at $J_c$ (Pa/min)
3.0	0.00	$J_c > 27.48$	4.32
3.0	1.25	25.18	11.01
15.0	1.25	20.60	20.61
3.0	2.50	$J_c > 27.48$	4.04
15.0	2.50	18.32	22.77

Based on the results in Section 3.2 (characterization of the *Harvester*), the TMP needed to generate a permeate flux of 19.5 L/m<sup>2</sup>/h is set to 136 mbar, considering fouling effects. Furthermore, the mean hydrostatic pressure above the membrane is taken into account. This value is thus taken as a minimum threshold value to generate a permeate flux in this range.

The actual power demand of all three pumps  $P_S$  was calculated by dividing the theoretical demand  $P_{\text{th}}$  by the pump-specific efficiency factor  $\eta$  (Equation (8)):

$$P_S = \frac{P_{\text{th}}}{\eta} \quad (8)$$

The energy required for the aeration of the membrane fibers  $P_a$  was calculated using Equation (9), including the aeration rate ( $\dot{V}_{\text{air}}$ )( $\dot{V}_{\text{air}}$ ) in m<sup>3</sup>/s together with the hydrostatic pressure above the gas outlet ( $p_{\text{hydro}}$ ) due to the water column.

$$P_a = \dot{V}_{\text{air}} \cdot p_{\text{hydro}} \quad (9)$$

## 3 | RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 | Membrane characterization

#### 3.1.1 | Critical flux experiments using baker's yeast

Prior to the start of each filtration experiment, DI-water was filtered at 23 L/m<sup>2</sup>/h for 45 min. The filtration data was used to calculate the membrane resistance  $R_m$  for every approach according to Equation (1) (see Supporting Information Figure S1).

Five sets of experimental conditions regarding DBM concentration and aeration rates of the membrane fibers were applied to determine the  $J_c$  value for yeast suspensions (see Table 2). In line with other studies [23, 27–

32], a decrease of the CF (from 25.18 to 20.60 L/m<sup>2</sup>/h) with increasing biomass concentrations (from 3.0 to 15.0 g DW/L) for an aeration rate of 1.25 vvm was measurable. Yet, the effect of cell concentration on CFs has not been fully clarified—changes in viscosity or the diffusion coefficient and surface interactions are described theories [23].

Aeration of the membrane surface can have two opposite effects: on the one hand, air bubbles create shear forces along the membrane surface, causing the transportation of particles into the bulk phase and thereby a reduction of the build-up of a filter cake as well as concentration polarization [32–35], which is the case for low cell concentrations (3.0 g DW/L) in this study.

On the other hand, vigorous bubbling increases cell stress and can even lead to its rupture [34, 36–38]. Cell debris together with exposed small intracellular substances has been identified as main reasons for membrane fouling [34, 35, 38–40]. For a biomass concentration of 15.0 g DW/L, a slight decrease of  $J_c$  was observed, when aeration was doubled. Foam formation was present during this experiment indicating protein release due to cell rupture caused by high shear rates created by the augmented bubbling.

The effect of aeration intensity on the CF using a submerged flat sheet membrane module was studied [28]. The authors found a linear increase of the CF with augmenting aeration rate for cell concentrations (sludge) between 9.6 and 22.6 g DW/L. The slope of the curves and thereby the influence of the aeration rate became more significant for high cell densities. The data also indicated a slight reduction of  $J_c$  when exceeding a specific bubbling rate (about 1.0 vvm), which is in line with the presented results. Alipourzadeh et al. investigated the effects of biomass concentration (*C. vulgaris*) and aeration rate of the membrane surface on the filtration performance of a submerged flat sheet membrane [37]. Their model-supported studies showed an optimal aeration rate of 1.25 vvm to reduce fouling effects on the membrane surface (mainly cake build-up), which is consistent with the results of this work. The positive impact of bubbling was proven to be more significant at lower biomass concentrations (~0.65 g DW/L) implying a prevalent effect of the increased fouling caused by cells compared to the reductive effect of the air bubbling. In general, aeration enhances the turbulence along the membrane and helps to reduce the accumulation of microalgae cells. Bubbling intensities above the optimal value can cause the development of shear forces resulting in cell rupture and even amplified irreversible fouling effects [37].

Without aeration, the CF for the yeast suspension (3.0 g DW/L) was not reached within the flux interval tested, indicating a high CF of more than 27.48 L/m<sup>2</sup>/h.

This was not expected as cells can easily form a cake layer on the membrane surface without bubbling. During the experiment, sedimentation inside the filtration chamber of the *Harvester* was visible, accompanied by an obvious dilution and a slight color change of the yeast culture. *S. cerevisiae* is a facultative anaerobic microorganism; it can switch its metabolic activities to anaerobic fermentation when leaking oxygen, which can occur in the absence aeration of the membrane fibers. However, no energy source (sugar) was provided in the buffer suspension to generate the yeast suspension. The absence of sugar and oxygen to maintain the basic cellular metabolism can explain the described differences of this experimental set-up. Hence, the changes of the biomass as well as the cell concentration during the experiment did not allow to evaluate and compare the CF correctly under the given conditions. To conclude, the physiological performance of the biomass is important for a filtration process as well as its evaluation.

### 3.1.2 | Critical flux experiments with microalgae

Prior to each filtration experiment, DI-water was filtered at 20–23 L/m<sup>2</sup>/h for 45 min. The filtration data were used to calculate the membrane resistance  $R_m$  for every approach according to Equation (1) (see Supporting Information Figure S1).

Figure 2 demonstrates a typical permeate-flux and TMP time profile (*Chlorella* B, 10.0 g DW/L, 1.25 vvm) for the CF experiments conducted applying the flux-step method. An increase in TMP of >10 Pa/min at a constant permeate flux was used as CF criteria.

Microalgae biomass grown in any medium contains—apart from cells—cell debris as well as small soluble molecules (extracellular organic matter, EOM) produced by the microalgae metabolism. Several studies have revealed the fouling propensity of all constituents of such suspensions [20, 26, 40]. EOM has been identified as to cause irreversible fouling, resulting in a permanent blockage of the membrane pores. Cells alone are responsible for the build-up of reversible filter cakes on the membrane surface that can be nearly totally removed by back-flushing. The consortium of cells, cell debris and EOM can create dense filter cakes on the membrane surface that increase the filtration resistance but help to reduce irreversible fouling effects [34, 35, 39]. Compared to the model culture (yeast) in the previous section, the filtration of *Chlorella* cultures resulted in higher rates of pressure-increase (dTMP/dt) and lower CFs due to the presence of EOM and cell debris (see Tables 2 and 3).

Consistent with the results in Section 3.1.1, a decrease of the CF was measured with increasing cell concentration.

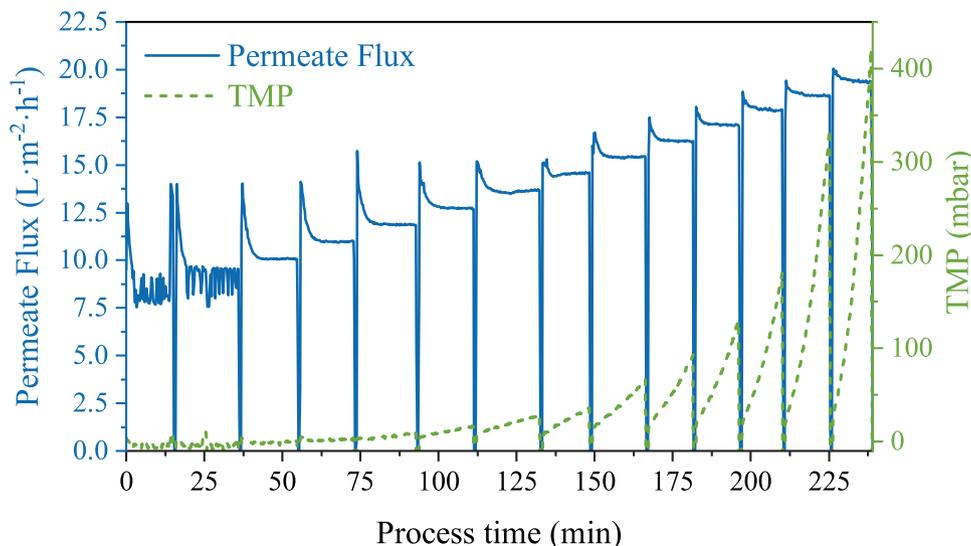


FIGURE 2 Exemplary permeate-flux and TMP time profiles for the flux stepping method using *Chlorella* B (10.0 g DW/L) at an aeration rate of 1.25 vvm

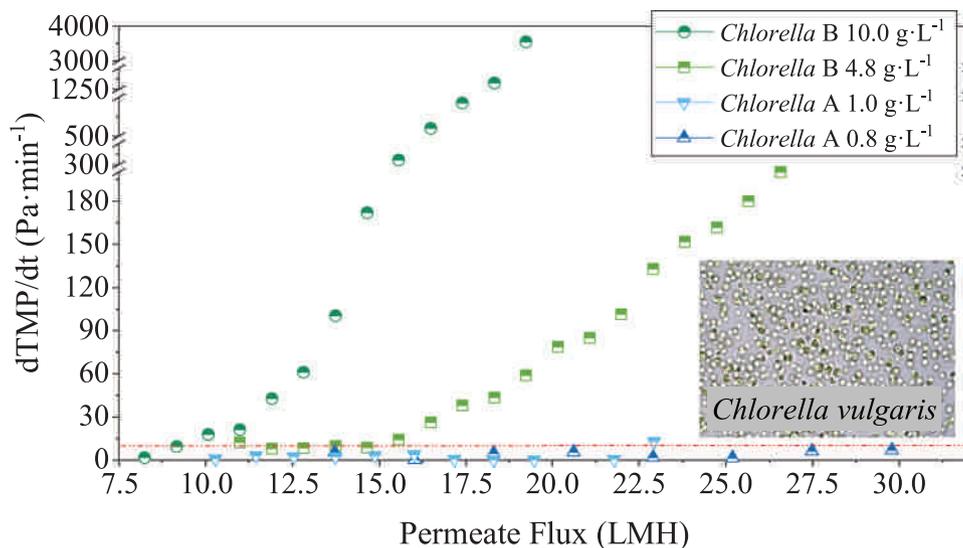


FIGURE 3 Dependence of  $d\text{TMP}/dt$  versus permeate flux of *Chlorella* cultures (*Chlorella* A – axenic, *Chlorella* B – non-axenic) at various biomass concentrations (0.8, 1.0, 4.8, 10.0, and 17.5 g DW/L) under an aeration rate of 1.25 vvm

In all cases, a negative linear correlation of DBM (of 1.0–10.0 g DW/L) and  $J_c$  was found ( $R^2 = 0.97$ ), which is in line with other studies [29, 41]. Contrary to those findings,  $J_c$  stagnated for higher cell concentrations (10.0 and 17.5 g DW/L), which was accompanied by a lower pressure increase ( $d\text{TMP}/dt$ , Table 3) measured for the highest biomass concentration. In contrast to these findings, the time profiles of the permeate flux and TMP showed an obviously higher fouling occurring for the higher concentrated microalgae culture: a stable permeate flux above 15 L/m<sup>2</sup>/h could not be achieved for this culture despite higher setpoints (see Supporting Information Figure S2).

A flux decrease could be observed, although the TMP is increasing constantly up to 150 mbar. Preliminary experiments revealed that the membrane used is compressible resulting in a pressure-dependent membrane resistance  $R_m$  (Equation (10),  $R^2 = 0.98$ , see Supporting Information Figure S3):

$$R_m = 4.135 \times 10^{11} + 2.004 \times 10^{10} \cdot \text{TMP}^{0.6648} \quad (10)$$

In consequence, the membrane pores were “squeezed” together and therefore the membrane resistance was increased, which led to a decrease of the flux at a specific

**TABLE 3**  $J_c$  and CF criterion dTMP/dt of *Chlorella* cultures (*Chlorella A* – axenic, *Chlorella B* – non-axenic) at various biomass concentrations (0.8, 1.0, 4.8, 10.0, and 17.5 g DW/L) with an aeration rate applied on the membrane fibers of 1.25 vvm

Microalgae species	Biomass concentration (g DW/L)	Aeration (vvm)	$J_c$ (L/m <sup>2</sup> /h)	dTMP/dt at $J_c$ (Pa/min)
<i>Chlorella A</i>	0.8	1.25	$J_c > 32.06$	6.95
<i>Chlorella A</i>	1.0	1.25	$J_c > 22.93$	12.11
<i>Chlorella B</i>	4.8	1.25	15.57	14.45
<i>Chlorella B</i>	10.0	1.25	10.08	18.04
<i>Chlorella B</i>	17.5	1.25	10.08	15.27

TMP. In this case, the CF was not suitable to depict the differences in fouling behavior between the two suspensions with the biomass concentration of 10.0 and 17.5 g DW/L.

A higher increase of the pressure with time (dTMP/dt, see Figure 2) was observed for the denser *Chlorella B* cultures (non-axenic, 4.8 and 10.0 g DW/L) compared to the low cell concentrations (0.8 and 1.0 g DW/L). This can be attributed to the increased biomass concentration as already discussed. Nevertheless, other factors need to be considered, namely microalgae species, culture variability, and cultivation conditions.

**Microalgae species:** As indicated by the microscopic pictures, the cell size of both *C. vulgaris* strains was within the range of 2–10  $\mu\text{m}$ , as previously reported [42]. The differences in filtration performance have usually been attributed to cell surface characteristics, which can influence the interaction of cell and membrane surface together with the amount and varieties of EOM produced by the microalgae metabolism. Small molecules like EOM can enhance interactions between solid particles as well as with the membrane enhancing membrane fouling [35, 39, 43]. Without further investigation, no clear conclusion can be drawn about those aspects.

**Culture composition:** Non-axenic *Chlorella B* culture was cultivated outdoors in an open reactor system and thus, some bacteria might be present which are absent in the axenic culture (*Chlorella A*). It is well known that the structure and density of filter cakes on membrane surfaces are influenced by the composition of the cultures to be filtered [35, 39]. Small solid particles usually cause high filtration resistances whereas larger particles create high porous filter cakes. Furthermore, the size distribution of solid particles influences the structure of the filter cake occurring: Consortia with large particle size distributions tend to increase the packing density of the building-up filter cake structure and thereby its additional resistance to filtration. Voids between larger particles within the cake are filled by smaller particles resulting in a high cake density [44, 45]. The cell size distribution in the *Chlorella B*

culture was wider compared to the *Chlorella A* culture due to the presence of bacteria, which are usually smaller than microalgae cells [1]. Therefore, an influence of the cell size distribution to the increase of the TMP (dTMP/dt) cannot be neglected.

**Culture conditions:** The culture conditions of the two *Chlorella* cultures used were different. The culture of *Chlorella A* originates from a large-scale laboratory reactor with controlled conditions. In contrast, *Chlorella B* was grown outdoors under natural conditions (concerning temperature and light). The microalgae cultures were thus exposed to an unstable and not-optimized environment. Unfavorable conditions like low temperatures or high irradiance can lead to cell stress accompanied by an increased content of cell debris and/or a higher production of EOM resulting in higher membrane fouling.

To conclude, the results showed a linear increase of the CF with increasing biomass concentration up to 10.0 g DW/L equivalent accompanied by rising membrane fouling. Higher cell concentrations lead to more pronounced fouling but cannot be simply detected by the  $J_c$  due to the necessity of high forces leading to a membrane compressing. Additionally, the variation in the culture composition and conditions can be considered to explain higher dTMP/dt rates of *Chlorella B* cultures compared to *Chlorella A*.

An overview of several studies measuring the CF of various microalgae, mostly *Chlorella* species using microfiltration (MF) and UF membranes is shown in Table 4. Various microalgae species have been tested, whereat *Chlorella* occurred the most. The data illustrates several differences and trends concerning membrane pore size, cell size, and biomass concentration influencing the CF.

CFs for MF membranes are typically higher for the comparable cell concentrations and species as compared to UF membranes. This is valid for example for the culture of *C. pyrenoidosa* at a biomass concentration of 0.3 g DW/L, the CF is higher for the MF membrane compared to the UF membrane [47]. This effect can be explained by the usually lower resistance of MF membranes due to the larger pore size and thereby higher permeability. Furthermore,

**TABLE 4** Comparison of CFs for various microalgae species and biomass concentrations using submerged microfiltration (MF) and ultrafiltration (UF) membranes. The CF criterion is an important factor for the evaluation of  $J_c$ , which is mainly influenced by the pore size of the membrane and the biomass concentration of the suspension applied

Membrane		Microalgae species (cell size in $\mu\text{m}$ )	Biomass concentration (g DW/L)	$J_c$ (L/m <sup>2</sup> /h)	CF Method CF criterion Starting flux $J_{\text{start}}$ (step height)	Ref	
Configuration	Specification						
Submerged, external, flat sheet	MF	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	0.3	27 (15°C)	FS-IFM	[46]	
	PVDF			30 (25°C)	20 Pa/min		
	0.1 $\mu\text{m}$			42 (35°C)	$J_{\text{start}}$ 15 L/m <sup>2</sup> /h (3 L/m <sup>2</sup> /h)		
Submerged, internal, flat sheet	MF	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	0.3	42	FS-IFM	[47]	
	PVDF				20 Pa/min		$J_{\text{start}}$ 10–15 L/m <sup>2</sup> /h (2.5–3 L/m <sup>2</sup> /h)
Submerged, internal, hollow fibers	MF	<i>Chlorella</i> sp. ADE4	1.0	58.5	FS	[48]	
	HDPE				0.2 kPa/min		$J_{\text{start}}$ 42 L/m <sup>2</sup> /h (12–33 L/m <sup>2</sup> /h)
Submerged, external, hollow fibers	UF	<i>Chlorella vulgaris</i> (2–10 $\mu\text{m}$ )	0.0691	39.4	FS-IFM-R	[29]	
	PVDF		0.3709	16.6	20 Pa/min		
Submerged, internal, flat sheet	UF	<i>Chlorella vulgaris</i> (2–10 $\mu\text{m}$ )	0.41	>50	FS-IFM	[49]	
	PVDF	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (8–35 $\mu\text{m}$ )	0.23	>50	$J_{\text{start}}$ 10 L/m <sup>2</sup> /h (5 L/m <sup>2</sup> /h)		
Submerged, internal, flat sheet	UF	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	0.3	20/25	FS-IFM	[47]	
	PVDF				20 Pa/min		$J_{\text{start}}$ 10–15 L/m <sup>2</sup> /h (2.5–3 L/m <sup>2</sup> /h)
Submerged, external, hollow fibers	UF	<i>Chlorella vulgaris</i> (2–10 $\mu\text{m}$ )	0.8	>32.06	FS-B	This study	
	PVDF		1.0	>22.93	10 Pa/min		
	0.03 $\mu\text{m}$		<i>Chlorella vulgaris</i> (2–10 $\mu\text{m}$ )	4.8	15.57		C: $J_{\text{start}}$ 10.30–13.7 L/m <sup>2</sup> /h (1.16–2.30 L/m <sup>2</sup> /h)
			10.0	10.08	D: $J_{\text{start}}$ 9.16 L/m <sup>2</sup> /h (0.9 L/m <sup>2</sup> /h)		
Submerged, internal, flat sheet	UF	<i>Chlorella vulgaris</i> (2–10 $\mu\text{m}$ )	0.21	>50	FS-IFM	[13]	
	PVDF		0.73	40	10 Pa/min		
			1.43	35	$J_{\text{start}}$ 10 L/m <sup>2</sup> /h (5 L/m <sup>2</sup> /h)		
			<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (8–35 $\mu\text{m}$ )	0.25	>50		
			0.79	45			
1.52	30						
Submerged, external, flat sheet	UF	<i>Chodatella</i> sp.	$2 \times 10^6$ cells/mL	105	TMP-Step	[50]	
	Cellulose		OD <sub>684</sub> 0.472		–		
	MWCO: 10 kDA	<i>Chlorella vulgaris</i> (2–10 $\mu\text{m}$ )	$2 \times 10^6$ cells/mL	70	TMP <sub>start</sub> 35 kPa		
<i>Microcystis</i> sp.		$2 \times 10^6$ cells/mL	55	Step: 35 kPa			
Submerged, external, flat panel	UF	<i>Isochrysis</i> (3–5 $\mu\text{m}$ )	0.30	15	FS-B/FS-R	[30]	
	PES-PVD	<i>Chlorella vulgaris</i> (2–10 $\mu\text{m}$ )	0.40	50	–		
		<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (8–35 $\mu\text{m}$ )	0.30	50	$J_{\text{start}}$ 10 L/m <sup>2</sup> /h (10 L/m <sup>2</sup> /h)		
		5.00	45				
		10.00	40				
		<i>Pavlova lutheri</i> (5–7 $\mu\text{m}$ )	0.90	20			
		<i>N. oculata</i> (1–3 $\mu\text{m}$ )	1.60	35			
		8.86	10–20				
10.00	15						

Internal: inside PBR; external: separate from PBR; MF: microfiltration; UF: ultrafiltration; PVDF: polyvinylidene fluoride; HDPE: high-density polyethylene; PES-PVD: polyethersulfone polyvinylpyrrolidone; MWCO: molecular weight cut-off; CF: critical flux; FS: flux-stepping; IFM: improved flux-step method; -B: backflushing; -R: relaxation.

cell size seems to inversely influence CF values: Microalgae species with smaller cell size, for example, *Isochrysis*, tends to have lower values (15 L/m<sup>2</sup>/h) as compared to species with greater cell size (e.g., *C. vulgaris*,  $J_c = 50$  L/m<sup>2</sup>/h) at similar biomass concentrations (0.3–0.4 g DW/L), due to higher diffusion activities to the bulk phase and lower surface interactions with the membrane of smaller particles compared to bigger ones [23]. Microalgae cells of similar size (*Nannochloropsis oculata*, *C. vulgaris*) achieve comparable values for  $J_c$  (35 L/m<sup>2</sup>/h) for analogous culture densities (1.43–1.6 g DW/L) [13, 30]. The membrane material seems to have only little influence on the CF as comparable values for similar species and biomass concentrations of different, independent studies have been shown [23].

It must be emphasized that the CF-criterion in this study was set rather low to 10 Pa/min. This is an important variable for the evaluation of  $J_c$  and needs to be taken into account when comparing those values. Keeping this fact in mind it can be concluded that the filtration performance (as measured by the CF) of the filtration device *Harvester* presented in this study falls within this range, or even prevails comparable set-ups.

The CF defines the upper limit of the membrane performance, where a stable filtration process without severe fouling can be performed. A filtration device can never be run at its maximum as to avoid capacity overload and to guarantee its optimal efficiency. Flux values either applied for microalgae harvesting (first step of dewatering or up-concentration) or as a part of a microalgae membrane bioreactor (internal or external) are set below the threshold of the membranes used [39, 51, 52] to sub-critical values of, for example, 85% of  $J_c$  [13]. Therefore, *Harvester* can be classified as suitable for both criteria addressing microalgae harvesting.

### 3.2 | Microalgae filtration tests

In order to characterize the filtration performance of the *Harvester* (“proof-of-concept”), the cultures of *Chlorella* B at four biomass densities were prepared and filtered to test the capacity of the membrane. The VRF, concentration factor ( $F_C$ ), and the harvesting efficiency ( $\eta$ ) were calculated according to Equations (2)–(4) in Table 5. Due to limited time, all filtration experiments were restricted to a maximum of 1–4 h.

When the culture of biomass density of 1.53 g DW/L was used a maximum  $F_C$  of 12.4 and VRF of 11.5 could be achieved within the short time of testing. Furthermore, for initially denser *Chlorella* cultures, cell densities of up to 40 g DW/L (in retentate) are achievable by the *Harvester*. Fouling control (aeration of the membrane fibers and periodic backflushing) was thus effective and allowed to set up

**TABLE 5** VRF and concentration factor ( $F_C$ ) for filtration of the *Chlorella* B cultures using the described filtration device *Harvester*

Biomass concentration (g DW/L)		Aeration (vvm)	VRF	$F_C$
Start	End			
1.53	19.00	1.25	11.5	12.4
2.30	16.20	1.25	7.7	7.0
5.80	24.60	1.25	4.5	4.2
14.20	40.00	1.25	3.5	2.8

a stable filtration process even for high biomass concentrations (Figure 4). An up-concentration of the microalgae cells (e.g., from 14.20 to 40.00 g DW/L) as well as a continuous filtration of a biomass flux (14.20 g DW/L) producing a constant retentate stream of 40.00 g DW/L is feasible using the *Harvester*, as shown in Figure 4. The harvesting efficiency  $\eta$  varied between 78% and 93% within the first 30 min of each trial but went up to >99% after this short starting period.

According to the mass balance (see Equation (5) in Section 2.3.5), the biomass concentration in the retentate of the filtration device ( $c_{X,retentate}$ ) was influenced by the cell concentration in the feed/PBR ( $c_{X,feed}$ ) as well as by the quotient of feed and retentate flux ( $\dot{V}_{feed}$ ,  $\dot{V}_{retentate}$ ). Turbidity measurements inside the *Harvester* and the PBR proved the capability of the filtration device: the calculated concentration  $c_{X,retentate}$  was achieved after a short time (~20 min) with very low deviations (<1%). Furthermore, an up-concentration of the biomass of more than factor 2 (from 14.20 to 40.00 g DW/L) was reached in this experiment.

### 3.3 | Energy consumption

Table 6 summarizes the operational and device parameters used for the calculation of the energy demand of the *Harvester* for different process scenarios applying an arbitrarily chosen feed inflow of 100 m<sup>3</sup>/h. It needs to be mentioned that  $P_{th,feed}$  and  $P_{th,retentate}$  strongly depend on the local circumstances and are given here only as examples, while the energy used to generate the permeate flux is a central element subject of this investigation. The required pump power is calculated considering a pump efficiency factor, which was set exemplary to 0.7. This value usually varies between 0.6 and 0.8, depending on the pump used and is thus not crucial for a general idea of the plant performance. The energy needed for aeration is neglectable compared to the power requirement of the pumps (Table 6). Constructive optimizations need to be performed when applying the

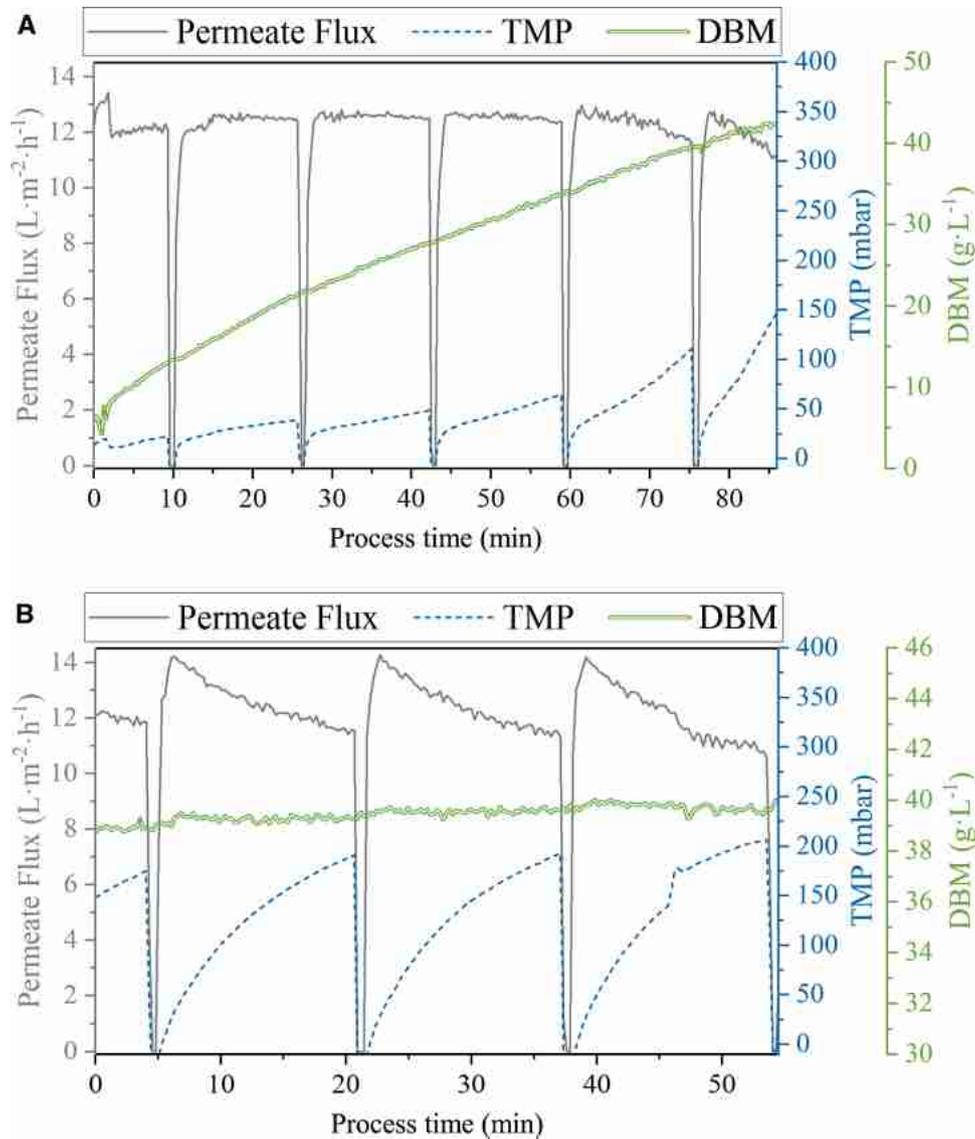


FIGURE 4 Permeate-flux, TMP, and DBM time profiles for different modes of operation (A: up-concentration  $c_{\text{Harvester}}$ : 14.2 → 40 g DW/L, B: continuous filtration  $c_{\text{Harvester}} = 40.0$  g DW/L) for the *Chlorella* B culture

TABLE 6 Operational and plant parameters used for calculation of energy consumption of the *Harvester*

Membrane aeration rate	Membrane surface	Permeate flux	Transmembrane pressure	Feed flux
1.25 vvm	1.31 m <sup>2</sup>	19.5 L/m <sup>2</sup> /h	13 635 Pa	100 m <sup>3</sup> /h
$2.5 \times 10^{-4}$ m <sup>3</sup> /s		$7.1 \times 10^{-6}$ m <sup>3</sup> /s		$2.8 \times 10^{-2}$ m <sup>3</sup> /s
$P_{\text{th,permeate}}$ (kJ/s)	$P_{\text{th,feed}}$ (kJ/s)	$P_{\text{th,retentate}}$ (kJ/s)	$\eta$ pumps (all)	Power demand aeration (kJ/s)
0.303	0.332	0.023	0.70	$1.194 \times 10^{-3}$

principle of the *Harvester* in large-scale and/or long-term operation to reduce the power demand of the feed pump, which is easily feasible. The energy required to maintain the TMP ( $P_{\text{th,permeate}}$ , Table 6) is thus the main power sink.

Different up-concentration scenarios are considered resulting in varying values for  $F_C$  and VRF (see Table 7). For this purpose, the biomass concentration in the input

*Chlorella* culture ( $c_{x,\text{Start}}$ ) is specified, as well as the desired concentration in the retentate ( $c_{x,\text{End}}$ ).

Compared to other studies [13, 53], a low energy demand was calculated for all scenarios considered (Table 7). Even for a rather high up-concentration from 2 to 40 g DW/L, the energy demand does not exceed  $1.05 \times 10^{-2}$  kWh/m<sup>3</sup> permeate or  $4.99 \times 10^{-3}$  kWh/kg harvested microalgae

**TABLE 7** Energy consumption by the filtration device *Harvester*: energy required per m<sup>3</sup> permeate ( $E_v$ ) and per kg of DBM in retentate ( $E_w$ ) for different concentration scenarios

Concentration proportion $c_{x,Start} \rightarrow c_{x,End}$ (g DW/L)	$F_C$	VRF	$E_v$		$E_w$	
			$\text{kJ/m}^3$	$\text{kWh/m}^3$	$\text{kJ/kg}$	$\text{kWh/kg}$
2 $\rightarrow$ 10	5	5	42.35	$1.18 \times 10^{-2}$	16.94	$4.71 \times 10^{-3}$
3 $\rightarrow$ 30	10	10	39.17	$1.09 \times 10^{-2}$	11.75	$3.26 \times 10^{-3}$
2 $\rightarrow$ 40	20	20	37.83	$1.05 \times 10^{-2}$	17.97	$4.99 \times 10^{-3}$

**TABLE 8** Energy consumption for microalgae harvesting for three scenarios combining filtration and centrifugation (for two preconcentration factors  $F_C$ ) or solely centrifugation ( $c_{x,Start}$ : 2 g DW/L,  $c_{x,End}$ : 250 g DW/L). The energy required per m<sup>3</sup> permeate ( $E_v$ ) and per kg of DBM in retentate ( $E_w$ ) are compared for a continuous algae feed of 100 m<sup>3</sup>/h

Scenario	Membrane filtration			Centrifugation			$E_v$ total ( $\text{kWh/m}^3$ )	Red.-%	$E_w$ total ( $\text{kWh/kg}$ )	Red.-%
	$F_C$	$E_v$ ( $\text{kWh/m}^3$ )	$E_w$ ( $\text{kWh/kg}$ )	$F_C$	$E_v$ ( $\text{kWh/m}^3$ )	$E_w$ ( $\text{kWh/kg}$ )				
I	–	–	–	125	7.99	3.99	7.99	0.00	3.995	0.00
II	5	$1.18 \times 10^{-2}$	$4.71 \times 10^{-3}$	25	1.60	0.16	1.61	79.85	0.165	95.87
III	20	$1.05 \times 10^{-2}$	$4.99 \times 10^{-3}$	6.25	0.40	0.01	0.41	94.87	0.015	99.62

Scenario I: direct up-concentration to desired DBM concentration only using centrifugation, Scenario II: two-step up-concentration using the *Harvester* as first step (fivefold concentration) followed by centrifugation as second step, Scenario III: two-step up-concentration using the *Harvester* as first step (20-fold concentration) followed by centrifugation as second step. Red.-%: relative energy reduction of two-step harvesting using membrane filtration compared to direct up-concentration only using centrifugation

biomass, respectively. Nevertheless, biomass concentrations suitable for the final process step in algae dewatering (e.g., drying) should reach between 150 and 250 g DW/L [8], which is not feasible using membrane harvesting. Therefore, the estimated energy consumption of a two-step microalgae harvesting process (first step: membrane filtration using the *Harvester*, second step: centrifugation) is illustrated in Table 8. Three scenarios are compared: (I) one-step dewatering applying centrifugation alone, (II) two-step process with fivefold up-concentration via filtration followed by centrifugation, and (III) two-step process with 20-fold up-concentration via filtration followed by centrifugation. The data required to calculate the energy consumption of the centrifugation was taken from literature [8, 13], assuming an energy demand of 7.99 kWh/m<sup>3</sup>. Table 8 demonstrates the predominance of a coupled dewatering process compared to one-step centrifugation: An energy reduction of ~80% per m<sup>3</sup> can be achieved even for a comparably low up-concentration of fivefold using the *Harvester*. For a preconcentration of 20-fold, the energy demand per kg harvested microalgae biomass is reduced by more than 99%. Assuming the cost of 10 cent/kWh (Germany), a microalgae dewatering process is thus economically feasible (max. 16.1 cent/m<sup>3</sup> and 1.65 cent/kg microalgae, respectively), if using this two-step process introduced, compared to the one-step centrifugation. The energy price—of course—can vary from region to region, thus the exact economic feasibility needs calculated case from case individually.

Summing up, using the *Harvester*, a microalgae suspension can effectively be up-concentrated as first step in the downstream process of microalgae biomass, which can then be followed by centrifugation to maintain high cell concentrations, as demonstrated in Tables 7 and 8. Membrane filtration can thus reduce the energy demand per kg DBM significantly (up to about 99%, Table 8) when coupling it to centrifugation [30]. Furthermore, the low energy demand allows the *Harvester* to be applied for cell recycling in continuous microalgae cultivation, for example, for the production of low-cost biomass or wastewater remediation.

## 4 | CONCLUSION

The present study revealed the suitability of the submerged aerated PVDF membrane UF device *Harvester* for microalgae harvesting. Comparable high fluxes (10.08 to >32.06 L/m<sup>2</sup>/h) can be realized for different biomass concentrations (0.8–17.5 g DW/L). Optimal operational conditions (fouling control via membrane aeration and back-flushing) allow a stable filtration handling high biomass concentrations (up to 40.0 g DW/L) efficiently. The very low energy demand makes the *Harvester* an ideal tool for the first up-concentration step in microalgae downstream processing. Further, it can be used for external cell recycling in continuous microalgae cultivation, e.g., deployed for wastewater treatment.

## NOMENCLATURE

Symbol	Units	Explanation
$\dot{V}$	L/min	Volumetric flow rate
$\mu(T)$	Pa s	Temperature-dependent viscosity
-B		Backflushing
C	g/L	Concentration (Indices: 0: Start, f: final, x: biomass)
<i>C. vulgaris</i>		<i>Chlorella vulgaris</i>
CF		Critical flux
DW		Dry weight
E	kJ/kWh	Energy (indices: v: per m <sup>3</sup> permeate, w: per kg algae biomass)
EOM		Extracellular organic matter
F <sub>C</sub>	-	Concentration factor
FS		Flux-stepping
g	kg m/s <sup>2</sup>	Gravity acceleration
H	m	Pumping height
HDPE		High-density polyethylene
IFM		Improved flux-step method
J	L/m <sup>2</sup> /h	Permeate flux
J <sub>C</sub>	L/m <sup>2</sup> /h	Critical flux
MF		Microfiltration
MWCO		molecular weight cut-off
OD		Optical density
P	-	Power (indices: th: theoretical, s: pump specific, a: aeration)
p	bar	Pressure (index hydro: hydrostatic)
PES-PVD		Polyethersulfone polyvinylpyrrolidone
PVDF		Polyvinylidene fluorid
-R		Relaxation
R <sub>m</sub>	m <sup>-1</sup>	Membrane resistance
<i>S. cerevisiae</i>		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TMP	mbar	Transmembrane pressure
TSS		Total suspended solids
UF		Ultrafiltration
VRF	-	Volumetric reduction factor
$\eta$	-	Efficiency factor
$\rho$	kg/m <sup>3</sup>	Density

## ACKNOWLEDGMENTS

This research was funded by the EU program Horizon 2020 (project SABANA, grant no. 727874).

Open access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

## CONFLICT OF INTERESTS

The authors have declared no conflicts of interest.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

## ORCID

Franziska Ortiz Tena  <https://orcid.org/0000-0002-8170-4485>

Clemens Posten  <https://orcid.org/0000-0001-5956-3180>

## REFERENCES

- Richmond, A., Hu, Q. (Eds.), *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester West Sussex UK 2013.
- Singh, G., Patidar, S. K., Microalgae harvesting techniques: a review. *J. Environ. Manage.* 2018, 217, 499–508.
- Barros, A. I., Gonçalves, A. L., Simões, M., Pires, J. C., Harvesting techniques applied to microalgae: a review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2015, 41, 1489–1500.
- Molina Grima, E., Acien Fernández, F. G., Robles Medina, A., Downstream processing of cell mass and products, in: Richmond, A., Hu, Q. (Eds.), *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester West Sussex UK 2013, pp. 267–309.
- Muyllaert, K., Bastiaens, L., Vandamme, D., Gouveia, L., Harvesting of microalgae: overview of process options and their strengths and drawbacks, in: Gonzalez-Fernandez, C., Muñoz, R. (Eds.), *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts: From Feedstock Cultivation to End-Products* Woodhead Publishing Series in Energy, Woodhead Publishing an imprint of Elsevier, Duxford, Cambridge, MA, Kidlington 2017, pp. 113–132.
- Mata, T. M., Martins, A. A., Caetano, N. S., Microalgae processing for biodiesel production, in: Melero, J. A., Luque, R. (Eds.), *Advances in Biodiesel Production: Processes and Technologies*. Woodhead Publishing Series in Energy, no. 39, Woodhead Pub Ltd, Oxford 2012, pp. 204–231.
- Al hattab, M., Microalgae harvesting methods for industrial production of biodiesel: critical review and comparative analysis. *J. Fundam. Renew. Energy Appl.* 2015, 05.
- Uduman, N., Qi, Y., Danquah, M. K., Forde, G. M. et al., Dewatering of microalgal cultures: a major bottleneck to algae-based fuels. *J. Renew. Sustain. Energy* 2010, 2, 12701.
- Alam, M. A., Wang, Z., *Microalgae Biotechnology for Development of Biofuel and Wastewater Treatment*, Springer Singapore, Singapore 2019.
- Bux, F., Chisti, Y. (Eds.), *Algae Biotechnology: Products and Processes*. Green Energy and Technology, 1st Ed., Springer, Switzerland 2016.
- Najjar, Y. S., Abu-Shamleh, A., Harvesting of microalgae by centrifugation for biodiesel production: a review. *Algal Res.* 2020, 51, 102046.
- Bauer, L., Ranglová, K., Masojidek, J., Drosig, B. et al., Digestate as sustainable nutrient source for microalgae—challenges and prospects. *Appl. Sci.* 2021, 11, 1056.
- Bilad, M. R., Discart, V., Vandamme, D., Foubert, I. et al., Harvesting microalgal biomass using a magnetically induced membrane vibration (MMV) system: filtration performance and energy consumption. *Bioresour. Technol.* 2013, 138, 329–338.

14. Grivalský, T., Ranglová, K., da Câmara Manoel, J. A., Lakatos, G. E. et al., Development of thin-layer cascades for microalgae cultivation: milestones (review). *Folia Microbiol. (Praha)* 2019, 64, 603–614.
15. Doucha, J., Lívanský, K., Novel outdoor thin-layer high density microalgal culture system: productivity and operational parameters. *Algol. Stud.* 1995, 76, 129–147.
16. Masojídek, J., Kopecký, J., Giannelli, L., Torzillo, G., Productivity correlated to photobiochemical performance of *Chlorella* mass cultures grown outdoors in thin-layer cascades. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2011, 38, 307–317.
17. Babaei, A., Ranglová, K., Malapascua, J. R., Masojídek, J., The synergistic effect of selenium (selenite, -SeO 32-) dose and irradiance intensity in *Chlorella* cultures. *AMB Express* 2017, 7, 56.
18. Ranglová, K., Lakatos, G. E., Câmara Manoel, J. A., Grivalský, T. et al., Growth, biostimulant and biopesticide activity of the MACC-1 *Chlorella* strain cultivated outdoors in inorganic medium and wastewater. *Algal Res.* 2021, 53, 102136.
19. Ranglová, K., Lakatos, G. E., Câmara Manoel, J. A., Grivalský, T. et al., Rapid screening test to estimate temperature optima for microalgae growth using photosynthesis activity measurements. *Folia Microbiol. (Praha)* 2019, 64, 615–625.
20. Kanchanapit, E., Su, B.-R., Tulaphol, S., Den, W. et al., Fouling characterization and control for harvesting microalgae *Arthrospira* (Spirulina) maxima using a submerged, disc-type ultrafiltration membrane. *Bioresour. Technol.* 2016, 209, 23–30.
21. Field, R. W., Wu, D., Howell, J. A., Gupta, B. B., Critical flux concept for microfiltration fouling. *J. Membr. Sci.* 1995, 100, 259–272.
22. Le Clech, P., Jefferson, B., Chang, I. S., Judd, S. J., Critical flux determination by the flux-step method in a submerged membrane bioreactor. *J. Membr. Sci.* 2003, 227, 81–93.
23. Bacchin P., Aimar P., Field R. W., Critical and sustainable fluxes: theory, experiments and applications. *J. Membr. Sci.* 2006, 281, 42–69.
24. Diez, V., Ezquerro, D., Cabezas, J. L., García, A. et al., A modified method for evaluation of critical flux, fouling rate and in situ determination of resistance and compressibility in MBR under different fouling conditions. *J. Membr. Sci.* 2014, 453, 1–11.
25. van der Marel, P., Zwijnenburg, A., Kemperman, A., Wessling, M. et al., An improved flux-step method to determine the critical flux and the critical flux for irreversibility in a membrane bioreactor. *J. Membr. Sci.* 2009, 332, 24–29.
26. Zhang, X., Hu, Q., Sommerfeld, M., Puruhito, E. et al., Harvesting algal biomass for biofuels using ultrafiltration membranes. *Bioresour. Technol.* 2010, 101, 5297–5304.
27. Metsämuuronen, S., Howell, J., Nyström, M., Critical flux in ultrafiltration of myoglobin and baker's yeast. *J. Membr. Sci.* 2002, 196, 13–25.
28. Wu, Z., Wang, Z., Huang, S., Mai, S. et al., Effects of various factors on critical flux in submerged membrane bioreactors for municipal wastewater treatment. *Sep. Purif. Technol.* 2008, 62, 56–63.
29. Cheng, T., Wei, C.-H., Leiknes, T., Polishing of anaerobic secondary effluent by *Chlorella vulgaris* under low light intensity. *Bioresour. Technol.* 2017, 241, 360–368.
30. Baerdemaeker, T. D., Lemmens, B., Dotremont, C., Fret, I. et al., Benchmark study on algae harvesting with backwashable submerged flat panel membranes. *Bioresour. Technol.* 2013, 129, 582–591.
31. Wicaksana, F., Fane, A. G., Pongpairoj, P., Field, R., Microfiltration of algae (*Chlorella sorokiniana*): critical flux, fouling and transmission. *J. Membr. Sci.* 2012, 387–388, 83–92.
32. Mo, W., Soh, L., Werber, J. R., Elimelech, M. et al., Application of membrane dewatering for algal biofuel. *Algal Res.* 2015, 11, 1–12.
33. Akhondi, E., Zamani, F., Tng, K., Leslie, G. et al., The performance and fouling control of submerged hollow fiber (HF) systems: a review. *Appl. Sci.* 2017, 7, 765.
34. Zhang, Y., Fu, Q., Algal fouling of microfiltration and ultrafiltration membranes and control strategies: a review. *Sep. Purif. Technol.* 2018, 203, 193–208.
35. Le-Clech, P., Chen, V., Fane, T. A., Fouling in membrane bioreactors used in wastewater treatment. *J. Membr. Sci.* 2006, 284, 17–53.
36. Zhang, Y., Tang, C. Y., Li, G., The role of hydrodynamic conditions and pH on algal-rich water fouling of ultrafiltration. *Water Res.* 2012, 46, 4783–4789.
37. Alipourzadeh, A., Mehrnia, M. R., Hallaj Sani, A., Babaei, A., Application of response surface methodology for investigation of membrane fouling behaviours in microalgal membrane bioreactor: the effect of aeration rate and biomass concentration. *RSC Adv.* 2016, 6, 111182–111189.
38. Luo, Y., Le-Clech, P., Henderson, R. K., Simultaneous microalgae cultivation and wastewater treatment in submerged membrane photobioreactors: a review. *Algal Res.* 2017, 24, 425–437.
39. Liao, Y., Bokhary, A., Maleki, E., Liao, B., A review of membrane fouling and its control in algal-related membrane processes. *Bioresour. Technol.* 2018, 264, 343–358.
40. Qu, F., Liang, H., Tian, J., Yu, H. et al., Ultrafiltration (UF) membrane fouling caused by cyanobacteria: Fouling effects of cells and extracellular organics matter (EOM). *Desalination* 2012, 293, 30–37.
41. Castaing, J. B., Massé, A., Séchet, V., Sabiri, N.-E. et al., Immersed hollow fibres microfiltration (MF) for removing undesirable micro-algae and protecting semi-closed aquaculture basins. *Desalination* 2011, 276, 386–396.
42. Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y. et al., Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: a review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2014, 35, 265–278.
43. Drexler, I. L. C., Yeh, D. H., Membrane applications for microalgae cultivation and harvesting: a review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 2014, 13, 487–504.
44. Kinnarinen, T., Tuunila, R., Häkkinen, A., Reduction of the width of particle size distribution to improve pressure filtration properties of slurries. *Miner. Eng.* 2017, 102, 68–74.
45. Wiącek, J., Stasiak, M., Effect of the particle size ratio on the structural properties of granular mixtures with discrete particle size distribution. *Granul. Matter* 2018, 20, 1–9.
46. Chu, H., Zhao, F., Tan, X., Yang, L. et al., The impact of temperature on membrane fouling in algae harvesting. *Algal Res.* 2016, 16, 458–464.
47. Zhao, F., Chu, H., Yu, Z., Jiang, S. et al., The filtration and fouling performance of membranes with different pore sizes in algae harvesting. *Sci. Total Environ.* 2017, 587–588, 87–93.
48. Boonchai, R., Seo, G., Microalgae membrane photobioreactor for further removal of nitrogen and phosphorus from secondary sewage effluent. *Korean J. Chem. Eng.* 2015, 32, 2047–2052.

49. Bilad, M. R., Vandamme, D., Foubert, I., Muylaert, K. et al., Harvesting microalgal biomass using submerged microfiltration membranes. *Bioresour. Technol.* 2012, 111, 343–352.
50. Chiou, Y.-T., Hsieh, M.-L., Yeh, H.-H., Effect of algal extracellular polymer substances on UF membrane fouling. *Desalination* 2010, 250, 648–652.
51. Zhang, M., Yao, L., Maleki, E., Liao, B.-Q. et al., Membrane technologies for microalgal cultivation and dewatering: recent progress and challenges. *Algal Res.* 2019, 44, 101686.
52. Bilad, M. R., Arafat, H. A., Vankelecom, I. F. J., Membrane technology in microalgae cultivation and harvesting: a review. *Biotechnol. Adv.* 2014, 32, 1283–1300.
53. Gerardo, M. L., Oatley-Radcliffe, D. L., Lovitt, R. W., Minimizing the energy requirement of dewatering *Scenedesmus* sp. by microfiltration: performance, costs, and feasibility. *Environ. Sci. Technol.* 2014, 48, 845–853.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of the article at the publisher's website.

**How to cite this article:** Ortiz Tena F, Ranglová K, Kubač D, Steinweg C, et al. Characterization of an aerated submerged hollow fiber ultrafiltration device for efficient microalgae harvesting. *Eng Life Sci.* 2021;21:607–622.

<https://doi.org/10.1002/elsc.202100052>

## 7.3 Submerged hollow-fiber-ultrafiltration for harvesting microalgae used for bioremediation of a secondary wastewater

**DOI:** 10.1016/j.seppur.2022.120744

**Journal:** Separation and Purification Technology, 2022, Volume 289, 120744

**Autoren:** Song Wang\*, Franziska Ortiz Tena\*, Rohit Dey, Claudia Thomsen, Christian Steinweg, Dennis Kraemer, Amit Dan Grossman, Yonas Zeslase Belete, Roy Bernstein, Amit Gross, Stefan Leu, Sammy Boussiba, Laurenz Thomsen, Clemens Posten

\* Gleichberechtigte Erstautoren

### Zusammenfassung

Die vorliegende Veröffentlichung beschreibt die Kultivierung von Mikroalgen in einem vorbehandelten, sekundären Abwasser aus einem anaeroben Membran-Bioreaktor (AnMBR-Abwasser). Die halbkontinuierliche Kultivierung fand über 24 Tage hinweg statt, wobei unterschiedliche N:P-Verhältnisse im Medium getestet wurden. Stickstoff wurde aus dem AnMBR-Abwasser um 68-94 % entfernt mit durchschnittlichen Raten von  $8-26 \text{ mg}_N \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  in verschiedenen Abschnitten der Kultivierung. Der gesamte vorhandene Phosphor war bereits kurz nach dem Inokulieren nicht mehr im Medium nachweisbar. Während der Kultivierung wurden Biomasseproduktivitäten von  $0,13$  bis  $0,19 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  erreicht. Eine Filtrationseinheit mit getauchter Hohlfasermembran fand für eine Untersuchung zur Bildung von Biofouling auf der Membranoberfläche Einsatz, eine der Herausforderung in der Aufarbeitung von Mikroalgenbiomasse. Die native Mikroalgensuspension zeigte dabei die höchste Fouling-Neigung, verglichen mit ihren einzelnen Fraktionen (Resuspension der Zellen, Überstand, AnMBR-Abwasser). Irreversibles Fouling trat bei allen Fraktionen hauptsächlich zu Beginn des Filtrationsprozesses auf. Gelöstes extrazelluläres organisches Material und Zelltrümmer im Überstand beeinflussten die Fouling-Ausbildung im Vergleich zu morphologischen Eigenschaften der Algenzellen stärker. Das AnMBR-Abwasser selbst führte ebenfalls zu einem deutlichen Membran-Fouling. Um dieses zu minimieren, sollte der Gehalt an Organik im Abwasser vor und während der Kultivierung kontrolliert werden. Da irreversibles Fouling hauptsächlich zu Beginn der Filtration auftritt und reversibles Fouling durch Rückspülen und Belüftung der Membran wirksam kontrolliert werden kann, ist die eingesetzte Membran für eine Langzeitfiltration geeignet. Die entstandene Mikroalgenbiomasse ist durch einen hohen Protein- und Kohlenhydratgehalt sowie einen niedrigen Schwermetallgehalt charakterisiert und daher für einen Einsatz als Futtermittel oder Ausgangsstoff für die Bioenergieerzeugung prädestiniert. Die vorliegende Veröffentlichung bietet damit neue Einblicke in die bisher wenig untersuchte Kopplung von Abwasserreinigung und Abtrennung der Mikroalgenzellen mittels Membranfiltration mit Fokus auf die Fouling-Kontrolle.



## Submerged hollow-fiber-ultrafiltration for harvesting microalgae used for bioremediation of a secondary wastewater

Song Wang<sup>a,f,1,\*</sup>, Franziska Ortiz Tena<sup>b,1</sup>, Rohit Dey<sup>a</sup>, Claudia Thomsen<sup>c</sup>, Christian Steinweg<sup>b</sup>, Dennis Kraemer<sup>a,2</sup>, Amit Dan Grossman<sup>d</sup>, Yonas Zeslase Belete<sup>d</sup>, Roy Bernstein<sup>d</sup>, Amit Gross<sup>d</sup>, Stefan Leu<sup>e</sup>, Sammy Boussiba<sup>e</sup>, Laurenz Thomsen<sup>a</sup>, Clemens Posten<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Physics and Earth Sciences, Jacobs University Bremen, Campus Ring 1, 28759 Bremen, Germany

<sup>b</sup> Institute of Process Engineering in Life Sciences, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Fritz Haber Weg 2, 76131 Karlsruhe, Germany

<sup>c</sup> iSeaMC GmbH, Campus Ring 1, 28759 Bremen, Germany

<sup>d</sup> Zuckerberg Institute for Water Research, The Jacob Blaustein Institutes for Desert Research, Ben-Gurion University of the Negev, Sede-Boqer Campus, 84990, Israel

<sup>e</sup> Microalgal Biotechnology Laboratory, French Associates Institute for Agriculture and Biotechnology of Drylands, The Jacob Blaustein Institutes for Desert Research, Ben-Gurion University of the Negev, Sede-Boqer Campus, 84990, Israel

<sup>f</sup> College of Life Sciences and Oceanography, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Microalgae  
Wastewater treatment  
Nutrient  
Microalgae harvesting  
Membrane filtration  
Biofouling

### ABSTRACT

Microalgae were employed to remove nutrients from a pre-treated wastewater (so-called anaerobic membrane bioreactor effluent, AnMBR effluent) over a 24-day semi-continuous cultivation with varied N:P ratios.  $\text{NH}_4^+$ -N reduction percentage ranged from 68 to 94% with average removal rates varying from 8 to 26  $\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}\text{d}^{-1}$  at different stages. Total phosphorus was almost completely removed shortly after inoculation. Biomass productivity ranged from 0.13 to 0.19  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\text{d}^{-1}$  during the cultivation. A submerged membrane-based filtration device was used to investigate the formation of biofouling, which occurred on the membrane surface during filtration and is considered as a bottleneck in downstream processing. Results indicated most severe fouling was caused by original microalgal suspension, compared to its individual fractions (cellular resuspensions, supernatant and AnMBR effluent). Irreversible fouling mainly occurred at the beginning of the filtration process; extracellular organic matter and cellular debris in the supernatant changed the fouling behavior more significantly than morphological properties of the algae cells; AnMBR effluent also led to a nonnegligible fouling effect. To minimize biofouling, TOC content in wastewater should be carefully controlled before and during cultivation. The current membrane can be proposed for long-term filtration, as irreversible fouling only occurred at the beginning and reversible fouling can be controlled effectively by backflushing and aeration. The biomass, characterized by relatively high protein and carbohydrate but low heavy metal content, indicated its potential as feeds and feedstock for bioenergy production. The present work provides novel insights into the coupling of wastewater treatment and fouling control, which has been rarely studied.

### 1. Introduction

Growing anthropogenic activities have been producing an increasing amount of wastewater (WW), most of which has not received adequate treatment before discharge into aquatic ecosystems [1,2]. According to an estimation, approximately 80% of the worldwide WW is released without treatment [2]. The discharge of untreated WW into the water bodies can result in serious environmental issues, particularly

eutrophication, due to nutrients enrichment (mostly nitrogen and phosphorus) [1,3]. Insufficient treatment also implies irreversible loss of nutrients from the nutrient-cycle. The application of microalgal technologies in WW treatment for nutrient recovery shows advantages over traditional means (anaerobic digestion and precipitation) which are cost- and energy-demanding [1,4]. The integration of WW remediation and algae cultivation has emerged as an approach to deal with the depleting water and energy sources. Several studies have already proven

\* Corresponding author.

E-mail address: [wangsong@szu.edu.cn](mailto:wangsong@szu.edu.cn) (S. Wang).

<sup>1</sup> Song Wang and Franziska Ortiz Tena made equal contributions to this manuscript.

<sup>2</sup> Present address: Federal Institute for Geosciences and Natural Resources, Stilleweg 2, 30655 Hanover, Germany.

the successful microalgae cultivation in municipal [5] as well as various types of industrial WW effluent [6–8] whereat satisfactory nutrients removal efficiencies have been achieved. It has been also found that phylum Chlorophyta, notably *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp., are efficient for WW remediation owing to their outstanding ability to remove nutrients, heavy metals and tolerance to pollutants [9].

Industrial WW can serve as cultivation medium as it contains high nutrient concentrations ( $15\text{--}90\text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$  and  $4\text{--}20\text{ mgP}\cdot\text{L}^{-1}$ ) that meet the demand of algal growth [10,11]. The harvested biomass could be valorized as feed supplementation, a sustainable source of biochemicals as well as feedstock for biofuels [12]. However, as microalgae can also adsorb heavy metals, it is important to monitor the heavy metal content in the microalgal biomass, serving as an indicator for downstream valorization process [13].

Moreover, harvesting of algal biomass is reported to be an energy- and cost-demanding step in downstream processing, accounting for 20–30% of the final costs for the biomass [14,15]. The small cell size of microalgae cells ( $<30\text{ }\mu\text{m}$  in length), similar density of cells and surrounding medium, diluted cultures ( $\sim 0.05\%$  dry solids), and negatively charged cell surface are the major challenges in microalgae harvesting [15,16] that can be overcome using membrane filtration for dewatering. Unlike conventional approaches, such as centrifugation or coagulation, membrane-based filtration is cost- and energy-effective, does not require chemicals and can minimize cell damage due to low shear stress [15]. Hence, as an economic dewatering technique it has attracted growing interests [17]. Nevertheless, membrane fouling has been considered a major bottleneck in filtration, which substantially increases the energy demand. Fouling of membrane pores (external and internal) is mainly dominated by pore blocking and cake layer formation, caused by cells, cell debris or extracellular organic matter (EOM) either excreted by the microalgal metabolism [17,18] or present in the WW to be treated. Environmental conditions, such as pH or temperature, culture stage and nutrient limitation can influence the amount and composition of EOM and thereby the fouling propensity. The mechanism of fouling formation is more complicated when filtering microalgae grown in WW. Therefore, a better understanding of the impact of WW-microbial suspension on fouling formation as well as an effective fouling-control strategy are hence of great importance for the whole process, especially for long-term operation. Nevertheless, WW treatment and fouling control during the harvesting process are usually examined separately.

Given that the direct influence of effluent after microalgal treatment upon fouling formation on submerged membrane filtration has been rarely reported, the current study hence focuses on the coupling of WW treatment and filtration: *i*) *Desmodesmus* sp. and *Coelastrrella* sp. are chosen to process an industrial WW. The WW has been pretreated by anaerobic membrane bioreactor (so-called AnMBR effluent) where 97% of total organic carbon has been removed [8]. The bioremediation performance was evaluated by measuring nutrients removal rate, percentage of reduction and biomass productivities over a 24-day semi-continuous cultivation. *ii*) Special emphasis was paid to analyze the fouling behavior by filtrating different fractions of the microalgal suspension directly after treatment of the effluent. The contribution of the individual fractions as well as the AnMBR effluent (control) to reversible and irreversible fouling on membrane was investigated and compared to reveal the mechanisms of fouling formation. *iii*) Macromolecular and elemental composition of harvested biomass has been analyzed as an approach to offset the cost of WW treatment. A mass balance indicated the fate of nutrients during WW treatment.

## 2. Material and methods

### 2.1. Microalgae cultivation and analytics

#### 2.1.1. Microalgae, effluent and cultivation conditions

Green algae *Desmodesmus* sp., isolated from a German municipal sewage plant and *Coelastrrella* sp., provided by Ben-Gurion University in

Israel, were employed to treat a secondary WW. It was initially treated by an anaerobic membrane reactor (AnMBR) system at Ben-Gurion University [8] and subsequently lyophilized for delivery to Germany. Domestic species were selected in this project for future large-scale implementation. The AnMBR effluent used for algal cultivation was prepared by dissolving the lyophilized powder with the supplementation of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  to compensate the loss of ammonium during lyophilization and adding A5 micro-nutrients, Fe-EDTA and  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  solution as buffer for pH. The initial composition of AnMBR effluent as well as the recipe of A5 micro-nutrients and Fe-EDTA solution can be found in the [supplementary material \(Tables S1 and S2\)](#). Algal stock was pre-cultured to the end of the exponential phase before the semi-continuous cultivation in 1 L bottle photobioreactors (PBRs) (diameter: 9 cm, filling height: 15 cm) using 800 mL AnMBR effluent. Cultures were grown at  $24 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$  and illuminated by fluorescent light tubes (L 58 W/840, OSRAM, Germany) at  $200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (measured at surface of the bottle closest to the illumination), under a light regime of 14 h light/ 10 h darkness. The pH was monitored and controlled to 7.0–8.1 by injection of  $\text{CO}_2$  and aeration was provided by an aquarium air compressor (LA-120-A1108-P3-1413, Nitto Kohki, Germany). Biological triplicates were prepared for each species. The initial concentration of ammonium nitrogen ( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ) and total phosphorus (TP) in the AnMBR effluent were  $147\text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$  and  $7.4\text{ mgP}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively.

#### 2.1.2. Semi-continuous cultivation

Semi-continuous cultivation was carried out for 24 days in six stages (0–5). Algae were grown for four days at each stage. At the end of stage 1 to 4, half of the volume of microalgal suspension was replaced with approximately equal volume of fresh AnMBR effluent when nutrients were depleted to minimize the water retention time. At the end of stage 1 and 2, algal suspension was replaced with original AnMBR effluent ( $7.4\text{ mgP}\cdot\text{L}^{-1}$ ), while suspension was exchanged with AnMBR effluent containing higher P concentration ( $10\text{ mgP}\cdot\text{L}^{-1}$ ) at the end of stage 3 and 4. Stage 0 and 1 were repeated to obtain enough microalgal suspension for the following filtration experiment (section 2.2) as well as biomass for heavy metal analysis (section 2.3). Water evaporation during cultivation was compensated by adding deionized water (DI).

#### 2.1.3. Measurement of dry biomass and nutrient concentration

An aliquot of algal suspension (20 mL at stage 1 and 2, but 10 mL at stage 3, 4 and 5) was taken every two days for measuring biomass concentration and residual nutrient concentrations ( $\text{NH}_4^+\text{-N}$  and TP). The microalgae sample was centrifuged three times (2000 g for three min for first two times and then 3000 g for five min) using DI water for cleaning to obtain the biomass. Dry biomass concentration was measured gravimetrically. Samples (3 mL) were filtered through pre-weighed GF/F filters, which were washed with DI water and dried at  $60\text{ }^\circ\text{C}$  overnight beforehand. Algae-free supernatant was obtained by filtration with  $0.2\text{ }\mu\text{m}$  cellulose acetate filter for nutrient measurement. Supernatant samples were diluted with DI water and prepared according to the manual in the corresponding kit for  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  and TP (LCK 305 and LCK 349, Hach, Germany) respectively. Concentrations of  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  and TP were calculated and recorded by a spectrophotometer (6320D, Jenway, UK).

### 2.2. Filtration of microalgal suspension

A laboratory-scale submerged membrane-based filtration device was used to investigate the development of fouling caused by filtration of the microalgal suspension directly after the treatment of the AnMBR effluent. The microalgal suspension was fractionated to cell-free supernatant and two kinds of cell resuspensions (cells resuspended in AnMBR effluent and DI water, respectively). These fractions, together with fresh AnMBR effluent (control), were evaluated individually in terms of contributions to fouling formation on the membrane.

### 2.2.1. Setup of the filtration device Mini-Harvester

An ultrafiltration unit (Mini-Harvester) was developed in laboratory scale (Fig. 1). The unit, with a volume of ~ 100 mL, is comprised of 12 aerated submerged PVDF hollow fibers (Puron® Hollow Fiber Rows, Koch Membrane Systems) with a nominal pore size of 0.03  $\mu\text{m}$  and a total membrane surface of 0.016  $\text{m}^2$ . Permeate was collected on the inner side of the fibers (outside-in application). A constant transmembrane pressure (TMP) of 100 mbar served as the driving force for the filtration process, provided and controlled by a vacuum pump (LABOPORT Model N820.3FT.18, KNF Neuberger, Germany). The algal suspension was fed by a peristaltic pump from a feed container. The temperature of feed, retentate inside the Mini-Harvester as well as permeate was measured with an infrared thermometer (TFI-250, Ebro, Germany). Furthermore, a multimeter was used to continuously monitor the pH and conductivity in the feed solution. Fouling was controlled by constant aeration of the fibers with compressed air as well as manual backwashing with DI water. Each filtration experiment lasted for 45 min including six consecutive cycles. The duration of cycle 1 to 3 was ten min, while cycle 4 and 5 lasted five min. The duration of cycle 4 and 5 was shortened to maximize the number of filtration cycles with limited amount of samples. Backflushing was applied for 45 s after each cycle using a syringe at 0.2 bar pressure monitored by a manometer with the volume noted.

### 2.2.2. Preparation of the microalgal suspension fractions for filtration

The original algae suspension (F1) at day 8 was centrifuged for ten min at 3000 g to separate the microalgal biomass from the supernatant which was subsequently centrifuged again at 10000 g for ten min to completely remove bacteria to get a cell-free supernatant (F2) containing EOM, excreted by microalgae metabolism (Fig. 2). The microalga and bacteria were resuspended in DI water (F3) and fresh AnMBR effluent (F4), respectively. Fresh AnMBR effluent (F5) was set as a control. The biomass concentrations, initial permeate fluxes and concentration factors for all fractions are summed up in Table S3.

### 2.2.3. Filtration data collection and processing

The mass of permeate during filtration was determined by a balance (PCB4000-1, Kern, Germany) and recorded over the filtration process. A cleaning procedure using diluted sodium hypochlorite as recommended by the manufacturer has been followed before filtration of each fraction to provide a baseline. Using the temperature dependent density of water  $\rho(T)$ , the mass of permeate ( $\Delta m$ ) within 30 s ( $\Delta t$ ) can be converted into the permeate flux  $J$  using equation Eq. (1), which is normalized to the membrane surface ( $M_{\text{Membrane}}$ ).

$$J = \frac{\Delta m}{\Delta t \cdot \rho(T) \cdot \hat{A} \cdot M_{\text{Membrane}}} \quad (1)$$

Before the filtration experiments, the membrane was conditioned by filtering DI water at 100 mbar (TMP) for at least 30 min. The water-flux of the clean membrane ( $J_w$ ) was recorded for ten min allowing the calculation of the clean membrane resistance  $R_m$ , according to Eq. (2). The temperature-dependent viscosity of the permeate  $\mu(T)$  was applied. [19]

$$R_m = \frac{\text{TMP}}{J_w \cdot \mu(T)} \quad (2)$$

The filtration of particle-loaded suspensions leads to an increase in the filtration resistance, due to the fouling effects. The total filtration resistance  $R_{\text{tot}}$ , to be overcome by the permeate, can be calculated with Darcy's Law (Eq. (3)) [19,20].

$$J = \frac{\text{TMP}}{R_{\text{tot}} \cdot \mu(T)} \quad (3)$$

The total filtration resistance  $R_{\text{tot}}$  is defined according to the resistance-in-series-model as the sum of  $R_m$  (resistance of the clean membrane) and  $R_{\text{fouling}}$  (the resistance caused by fouling effects), as indicated in Eq. (4).  $R_{\text{fouling}}$  is the combined result of the reversible ( $R_{\text{reversible}}$ ) and irreversible fouling resistance ( $R_{\text{irreversible}}$ ). Irreversible fouling is defined as fouling that cannot be removed by backflushing between individual filtration cycles, whereas reversible fouling can be removed by backwashing (Fig. S1) [21,22].

$$R_{\text{tot}} = R_m + R_{\text{fouling}} = R_m + R_{\text{reversible}} + R_{\text{irreversible}} \quad (4)$$

The backwash efficiency (BWE) is calculated, according to Eq. (5).  $J_n$  and  $J_{n-1}$  are the permeate fluxes after (n-1) and n backwashes, respectively. [23]

$$\text{BWE} = \frac{J_n}{J_{n-1}} \quad (5)$$

The BWE between cycle (n-1)-n stands for the BWE between cycle number n and (n-1), respectively.

### 2.3. Biomass analysis

Coupled N and P were removed from AnMBR effluent at day 8 (end of stage 1) but N was not completely removed in the following stages.

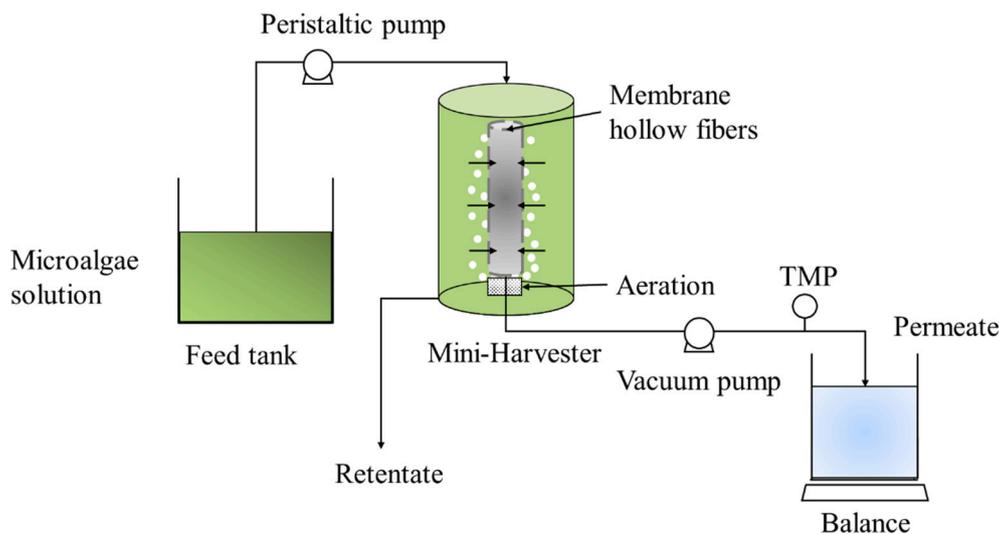
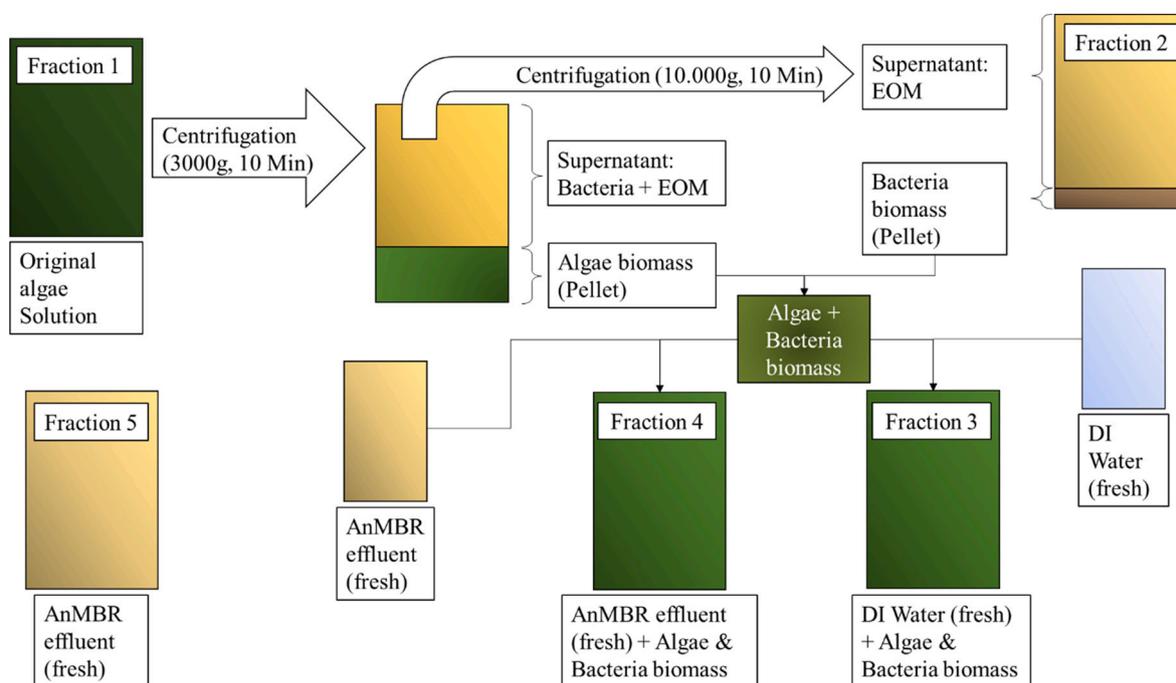


Fig. 1. Experimental setup of the ultrafiltration plant Mini-Harvester.



**Fig. 2.** Preparation of different fractions of microalgal suspension. Fraction 1 (F1): original microalgal suspension; Fraction 2 (F2): Supernatant after twice centrifugation (bacteria-free); Fraction 3 (F3): microalgal and bacterial resuspension in DI water; Fraction 4 (F4): microalgal and bacterial resuspension in fresh AnMBR effluent; Fraction 5 (F5): fresh AnMBR effluent.

Hence biomass at day 8 and 16 were biochemically characterized as the representative biomass collected under the two different conditions.

### 2.3.1. Analysis of the macromolecular composition

Total lipids, including neutral lipid, polar lipids and pigments, were extracted with a mixture of dichloromethane and methanol at a ratio of 1:1. Fatty acid methyl esters were subsequently prepared with our previous methods where the details of sample preparation and GC program were introduced [24]. A protein factor of 4.44 was applied to calculate the protein content based on the N content from the elemental analysis (Section 2.3.2) [25]. Total carbohydrate content was detected photometrically at 625 nm using Anthron reagent after sulfuric acid cell digestion and extraction using ethanol (external standard curve using D-glucose). All analysis was carried out in biological triplicates.

### 2.3.2. Major, minor and trace element compositions

Major elements, including C, N, S and H, were analyzed by an element analyzer (Vario Micro Cube, Elementar, Germany; reference measurement: sulfanilamid) using 2–4 mg dry biomass. Algal biomass, harvested by the Mini-Harvester (Section 2.2.1), was used for minor and trace metal analysis. The lyophilized samples were dried at 60 °C for at least 12 h before an aliquot of 50–250 mg was weighed into acid-cleaned PTFE open beakers and digested with 25 mL concentrated HNO<sub>3</sub> at 70–90 °C for two hours on a hot plate. The solutions were evaporated to incipient dryness and refilled with concentrated HCl twice and then filled up with 0.5 M HNO<sub>3</sub>. All reagents were of suprapure grade (Merck, Germany) and DI water (18.2 MΩ·m) was used for dilution of the concentrated acids. All sample solutions were filtered through 0.2 μm membrane cellulose acetate filters with acid-cleaned syringes. The sample solutions were further diluted with 0.5 M HNO<sub>3</sub> and measured with a Perkin Elmer NexION 350x ICP-MS coupled to an Elemental Scientific APEX system as well as with a Spectro Ciros Vision ICP-OES. For quality control, the certified reference standard BCR-670 was processed and analysed along with the algae samples. For details on the digestion method, quality control, use of internal standardization and instrument settings the reader is referred to [26].

The theoretical nutrient ( $e_{E,X}$ ) content of the biomass was calculated

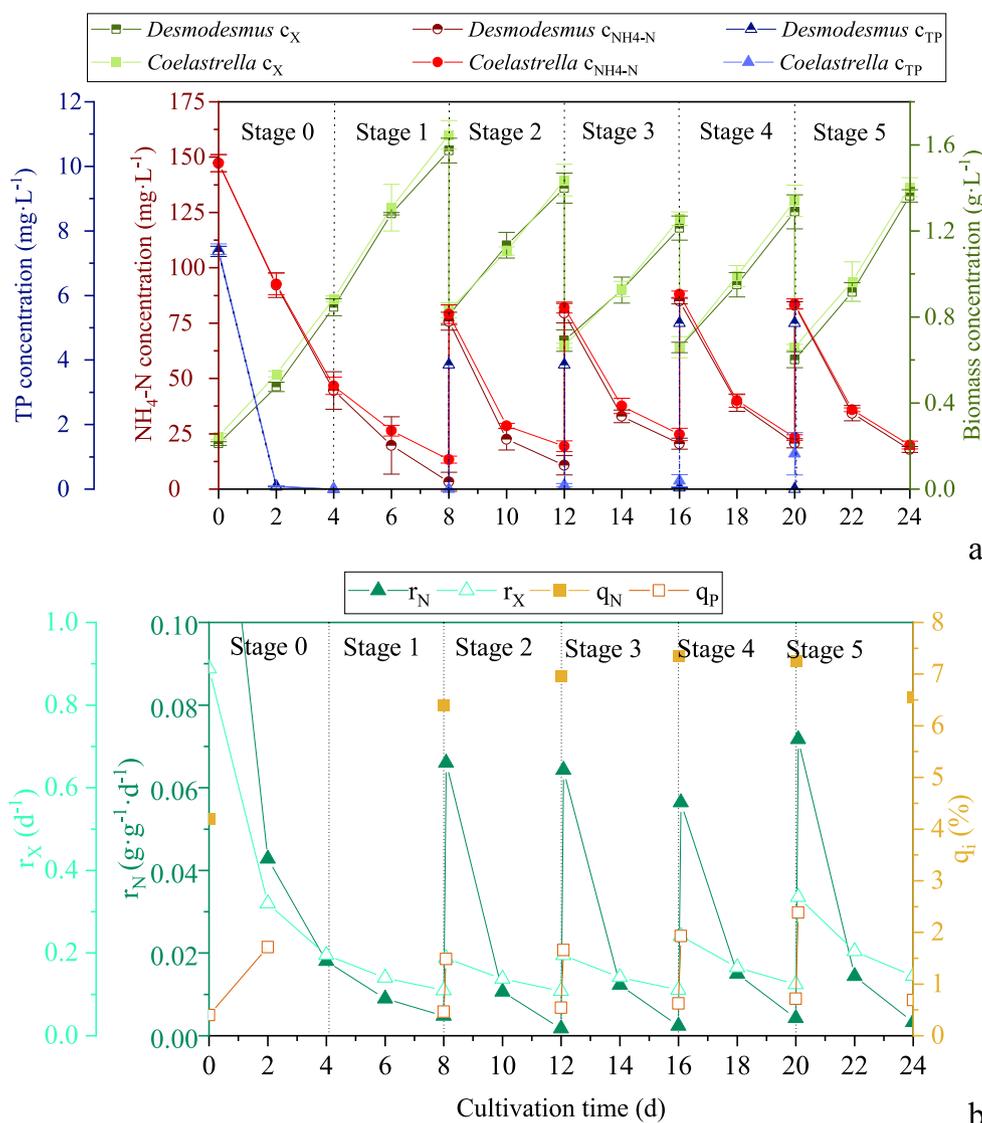
according to Eq. (6), using the starting ( $c_{start}$ ) and end concentrations ( $c_{end}$ ) of the nutrient (E) and biomass (X) in g·L<sup>-1</sup> of a considered time interval.

$$e_{E,X} = \frac{c_{E,start} - c_{E,end}}{c_{X,end} - c_{X,start}} \quad (6)$$

## 3. Results and discussion

### 3.1. Growth and nutrients recovery

As shown in Fig. 3a, both selected species acclimated very well to the AnMBR effluent and grew linearly without a lag phase in the N-rich effluent (147 mgN·L<sup>-1</sup>). The semi-continuous cultivation setup led to a hydraulic retention time (HRT) of approximately eight days for all stages. This relatively long HRT is a result of the high nutrient load in the effluent. Other WW streams containing less nutrients (4.0–40.5 mgN·L<sup>-1</sup> and 0.15–12.0 mgP·L<sup>-1</sup>) require shorter HRTs of 0.5–4 days [27]. *Desmodesmus* and *Coelastrrella*, although from different locations and environment, exhibited very similar performance in biomass accumulation and nutrients recovery. For both species, maximum biomass concentrations at the end of each stage ranged from 1.213 to 1.647 g·L<sup>-1</sup>, with average biomass productivities of 0.162 (*Desmodesmus*) and 0.168 g·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> (*Coelastrrella*), respectively. In a previous setup, biomass concentration of *Chlorella pyrenoidosa* was maintained at approximately 0.78 g·L<sup>-1</sup>, due to a relatively lower nutrient concentration in the influent [28]. The high biomass concentration due to the richness of nutrients in this study can be a challenge for filtration. The maximum biomass concentration, before exchange of algal suspension with AnMBR effluent at day 12 and 16 (stage 2 and 3) decreased, compared to day 8. In contrast, the maximum biomass concentration grown with higher TP concentration at days 20 and 24 (stage 4 and 5) increased compared to day 16. The mean growth rate and biomass productivity in Table 1 suggest that both species showed the highest growth rate at stage 0, as a low culture concentration allowed a better light penetration. The mean growth rate and biomass productivity of both species showed a descending trend from stage 1 to 3 but an ascending trend from stage 3



**Table 1**  
Biomass productivity, specific growth rate and nutrients removal efficiency.

		0	1	2	3	4	5
<i>Desmodesmus</i>	Mean specific growth rate (1·d <sup>-1</sup> )	0.35 ± 0.01	0.16 ± 0.02	0.14 ± 0.00	0.14 ± 0.02	0.17 ± 0.01	0.20 ± 0.01
	Biomass productivity (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	0.16 ± 0.01	0.18 ± 0.02	0.15 ± 0.01	0.13 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.19 ± 0.01
	Average NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N removal rate (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	25.68 ± 1.49	10.31 ± 1.11	16.27 ± 1.59	14.75 ± 1.51	16.07 ± 0.43	16.28 ± 0.74
	Percentage of NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N reduction (%)	69.80 ± 5.09	93.50 ± 7.79	85.74 ± 5.97	74.10 ± 3.99	75.65 ± 2.28	78.42 ± 2.03
<i>Coelastrella</i>	Mean specific growth rate	0.32 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.19 ± 0.00
	Biomass productivity (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	0.16 ± 0.01	0.19 ± 0.02	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.19 ± 0.01
	Average NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N removal rate (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	25.15 ± 1.54	8.33 ± 0.60	14.95 ± 0.52	14.33 ± 1.28	16.18 ± 0.09	15.96 ± 1.00
	Percentage of NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N reduction (%)	68.29 ± 2.97	71.47 ± 0.89	75.60 ± 1.84	69.81 ± 4.28	73.51 ± 1.06	76.19 ± 2.79

Results are displayed as mean ± SD (n = 3).

to 5. The mean growth rate and biomass productivity at stage 5 were significantly higher than at stage 3 ( $p < 0.05$ ), due to the higher TP concentration. The change in N:P ratio from 20:1 (147mgN·L<sup>-1</sup>, 7.4 mgP·L<sup>-1</sup>) to approximately 15:1 (147mgN·L<sup>-1</sup>, 10 mgP·L<sup>-1</sup>) in the AnMBR effluent had a positive impact on biomass accumulation, as reported in other studies [29,30].

The lowest NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N residual concentration after treatment occurred

at stage 1 for both species. Approximately 70% NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N was removed at stage 0, which led to the highest NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N uptake rate (25.68 and 25.15 mgN·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> for *Desmodesmus* and *Coelastrella*, respectively) at this stage. Moreover, the NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N removal rate and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N reduction percentage at stage 4 and 5 were not significantly higher than stage 3 for both species ( $p > 0.05$ ) (Table 1) despite the higher P concentration. In order to better understand the kinetic effects, specific uptake rates and cellular

quotas of the nutrients N and P are calculated and shown in Fig. 3b. The specific  $\text{NH}_4^+$ -N uptake rate followed the decreasing specific growth rate with varying light availability (high for low biomass and low for high biomass concentrations) between 0.01 and  $0.1 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . These values reflect the demand of the cells to keep a relatively constant nitrogen quota of about  $0.075 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Towards the end of the stages, the nitrogen uptake rate decreases with decreasing ammonium concentrations. This should not be misunderstood as a kinetic effect. In many other cultivations green algae have been shown to easily meet their demand at concentrations below  $c_{\text{NH}_4^+-\text{N}} < 1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Rather N uptake is connected to the P uptake. The specific phosphate uptake rate  $r_{\text{PO}_4}$  ( $0.011$  and  $0.016 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) has been estimated from the data in Fig. 3b. This is in the same order of magnitude as observed by Ruiz-Martínez [31] for *Scenedesmus* ( $7 \text{ mgP}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ). It is much higher than needed for even high specific growth rates to maintain the necessary phosphate quota (of  $\sim 2 \text{ gP}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Based on this, polyphosphate accumulation (luxury uptake) above the level of current cell requirement is assumed [32] in the first half of each stage. High values for the P-quota are between 1.5 and  $2.5 \text{ gP}\cdot\text{g}^{-1}$ . The low P quotas according to the low values of active biomass are 0.005 to  $0.007 \text{ gP}\cdot\text{g}^{-1}$  in the experiments at the end of the respective stages. As the initial N:P availability in the medium is higher than the Redfield ratio [33] approved by [34] with  $15 \text{ molN}\cdot\text{molP}^{-1}$ , phosphate limitation is assumed at the end of each phase. A low phosphate quota at the end of a respective stage corresponds to the reduction of the specific nitrogen uptake rate. Low phosphate content indicates that the cells cannot divide any more. As they also cannot store nitrogen, the nitrogen uptake is reduced, which is reflected by the continuous reduction of the specific nitrogen uptake rate. The further increase of biomass occurs due to starch accumulation. During medium exchange between two phases, nitrogen is discarded but not phosphate, leading to a preferable ratio inside the cells. A complete removal of N and P seems to be only possible if the N:P ratio is lower than the Redfield ratio to make use of the polyphosphate storage and avoid coupled phosphate and nitrogen limitation. A detailed analysis of stoichiometric coupling is

given by Beuckels [10]. Relatively higher TP concentrations in the WW can be handled by the cells via P accumulation leading to an even higher value as fertilizer.

The requirements for discharge from urban WW plant in Europe are  $10\text{--}15 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$  and  $1\text{--}2 \text{ mgP}\cdot\text{L}^{-1}$ , or a minimum reduction percentage of  $70\text{--}80\%$  for N and  $80\%$  for P, respectively (Council Directive 91/271/EEC concerning urban waste-water treatment and Commission Directive 98/15/EC). At the end of stage 1, all these requirements were met by both species but only the minimum percentage of reduction can be met in the following stages. Therefore, a balanced nutrients composition, especially N:P ratio, is important for a satisfactory performance. Furthermore, recycling of the biomass from the harvesting device back into the PBRs may be another solution to deal with the insufficient treatment.

As post-treated effluent at day 8 was the most representative in real WW treatment process, cultivation was repeated to day 8 to obtain enough suspension for filtration (section 3.2) and valorization (section 3.3) experiments.

### 3.2. Filtration of individual fractions of microalgal suspension

As mentioned in section 2.2.3, different types of fouling can develop during filtration of particle-loaded suspensions. Typically, a microalgal suspension contains algal cells, symbiotic bacteria, cell debris as well as EOM (Fig. 4). Small molecules, like EOM, tend to penetrate the membrane pores (pore constriction) and form gel layers on the membrane surface. Algal cells usually build up a filter cake on the membrane that can be removed by physical cleaning such as backflushing or aeration. Fouling that can be eliminated by backflushing is defined as reversible. In contrast, backflushing cannot remove all EOM settled inside the membrane pores leading to an irreversible fouling resistance ( $R_{\text{irreversible}}$ ) and thus contributes to both reversible and irreversible fouling. [18,22]

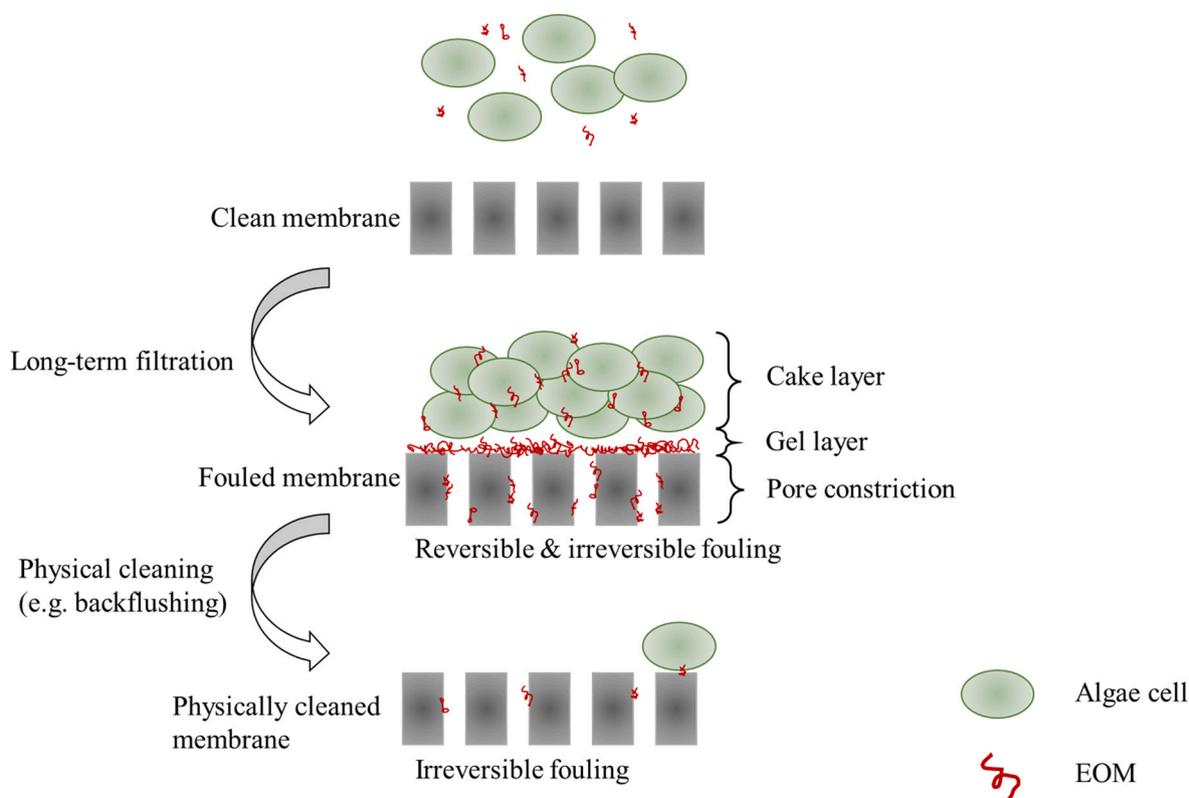


Fig. 4. Mechanisms of membrane fouling caused by microalgae cells and EOM.

### 3.2.1. Fractionated filtration of algal suspension – Differences between the individual fractions

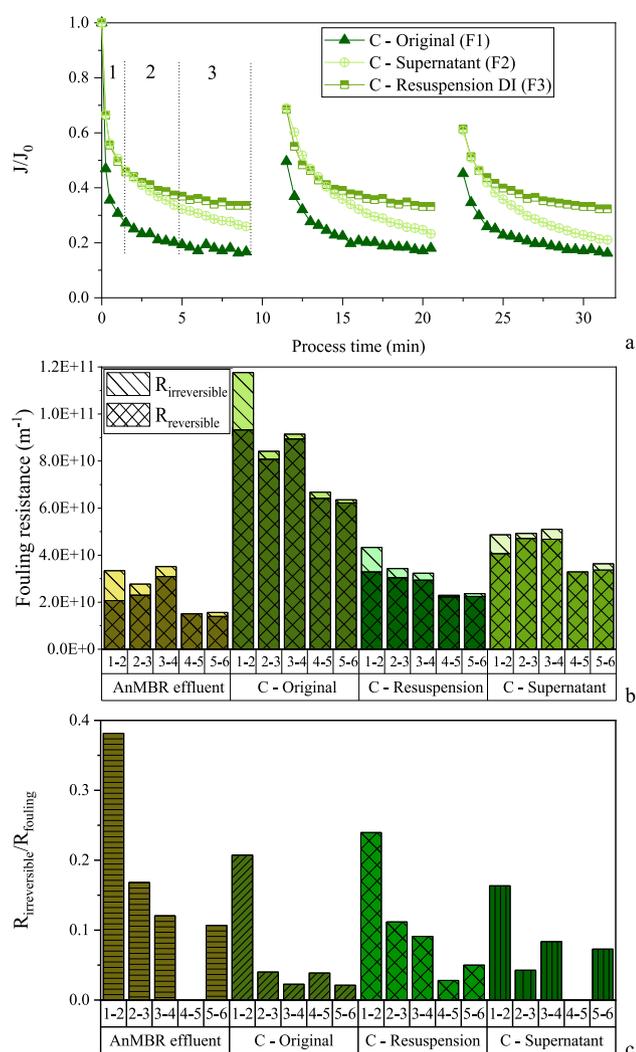
Determination of the clean membrane resistance ( $R_m$ ), before filtration of the fractionated algal suspension, provided a baseline for each filtration (Fig. S2). In line with our results, the filtration of a particle-loaded suspension above critical conditions caused a flux decline, when applying a constant transmembrane pressure to ultrafiltration membranes [35] (Fig. 5a and Fig. S3). The typical flux-time curve is comprised of three following phases [18,36], as indicated in Fig. 5a for *Coelastrella* and Fig. S3 for *Desmodesmus*, respectively. After a severe and rapid flux decline (phase 1), naturally caused by inner pore blocking of cell fragments and/or extracellular particles, a long gradual flux decrease occurs at phase 2. During phase 2, the formation of a cake layer has a dominant role in the flux decline, due to the accumulation of cells and cell fragments on the membrane surface. Further pore-blocking effects are thereby reduced, leading to the third phase, a pseudo-steady-state flux [36]. The cake layer creates an additional layer of resistance on the membrane surface ( $R_{\text{reversible}}$ ). The thickness of this layer grows over time and further increases the filtration resistance. When reaching the equilibrium cake thickness, the permeate flux remains quasi-constant (occurred for original suspension (F1) and resuspension

(F3)). If no steady-state flux could be reached (occurred for supernatant (F2) of both species), the growth of the cake layer might not have been finished yet [36]. A lower, sub-critical pressure should be applied in large-scale application, as all components of the algal suspension contribute to membrane fouling and thereby cause a decrease in flux.

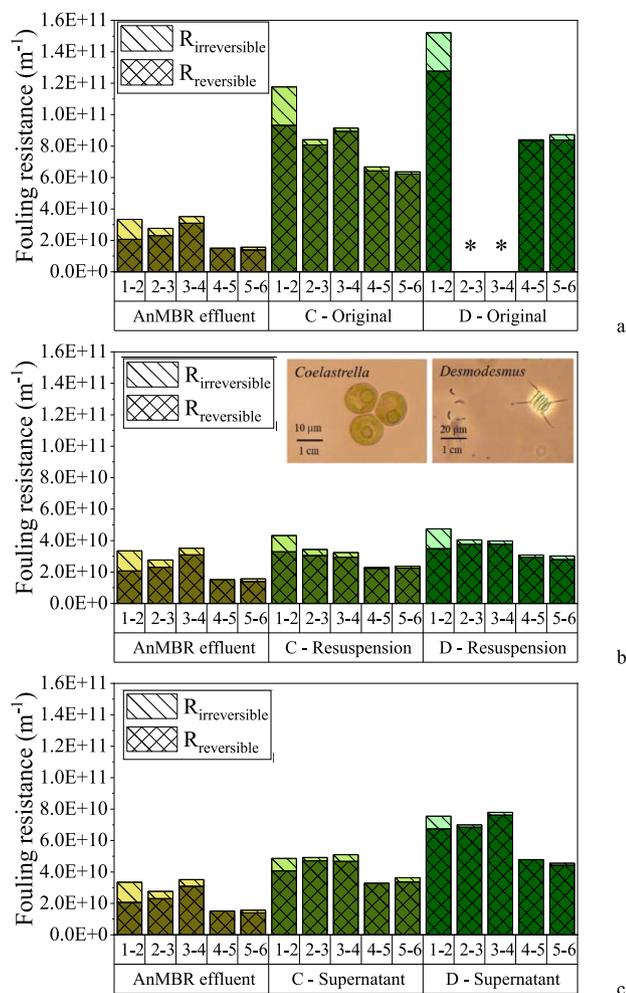
For both microalgae species, the filtration of the original suspension (F1), as expected, led to the highest flux reduction to 15–18% of the initial flux ( $J_0$ ) for each cycle (Fig. 5a and Fig. S3). The flux reduction by F3 was significantly lower (~27–33% of  $J_0$ ) for F1. This can be explained by the absence of EOM in F3, as EOM has been identified as a major foulant. A cake formed on the membrane surface can lead to an augmented but constant filtration resistance [23]. Both F1 and F3 showed a quasi-steady-state flux at phase 3, which was more distinctive for *Coelastrella* than *Desmodesmus* (Fig. 5a and Fig. S3). The filtration data indicated that the equilibrium cake thickness was reached within a short time (~5 min), as a stable permeate flux was visible for F1 and F3. Different from previous studies, F2 led to a higher flux reduction than F3 [19,23]. F5 was set as a control to evaluate the impact of ANMBR effluent on membrane fouling. A flux reduction to ~25–30% of  $J_0$  was detected in the filtration of F5, almost as high as F2 for both species (Fig. S4). Thus, it can be inferred that the effluent used for algae cultivation contributed substantially to the fouling effect, which is discussed with more details in section 3.2.3. F2 led to the most severe flux reduction than the other fractions, as it contains EOM and the AnMBR effluent as culture medium for algae.

To further examine the fouling behavior of the different fractions, the fouling resistance  $R_{\text{fouling}}$  was determined (Fig. 5b).  $R_{\text{fouling}}$  is the sum of the reversible ( $R_{\text{reversible}}$ ) and irreversible ( $R_{\text{irreversible}}$ ) fouling resistance (Eq.4). Furthermore, the quota of  $R_{\text{irreversible}}$  in  $R_{\text{fouling}}$  was evaluated (Fig. 5c) to estimate the irreversibility of the fouling caused by a specific fraction (high quota means strong irreversible share). Corresponding to the severe flux reduction of F1, the filtration resistance of F1 occurred between the cycles was higher than its fractions (Fig. 5b), due to the cumulative effect of algal cells, cell debris, EOM (by algae) and organic substances (TOC from AnMBR effluent). For F1 and F3, irreversible fouling decreased gradually to its minimum (Fig. 6c), probably caused by the formation of an equilibrium between the formation of the cake layer on the membrane surface by the microalgae cells and its dissolution [36]. F3 showed the lowest  $R_{\text{fouling}}$  as well as  $R_{\text{irreversible}}$ , due to the absence of EOM in this fraction. EOM has been identified as a major foulant [37] because of strong static interactions with the membrane and slow back transportation into the bulk solution [19], which agrees with our results. Small molecules like EOM, together with cell fragments, can cause inner pore blocking and thereby create an irreversible fouling resistance. Nevertheless, the  $R_{\text{irreversible}}/R_{\text{fouling}}$  during the filtration of F1 was similar to that of F3 in cycle 1–2 but lower than F3 in cycles 2–3 to 5–6. This suggested the irreversibility of fouling (mostly caused by EOM) was reduced, probably due to the formation of a dense filter cake formed by high cell concentration as well as interactions between cells and EOM, during the filtration of F1 [37]. The cake thereby prevented the EOM from further penetrating and blocking the membrane pores irreversibly. As indicated by the flux profile (Fig. 5a), filtration of F2 resulted in a slightly higher fouling resistance than F3. The varying quota of  $R_{\text{irreversible}}/R_{\text{fouling}}$  underlined that no equilibrium cake thickness was reached for F2 within the filtration interval. In contrast to F1, the soluble substances present in F2 could penetrate the membrane pores permanently, resulting in severe irreversible fouling and increasing  $R_{\text{irreversible}}$ . The fouling resistance caused by F5 was nearly as high as for F3 (Fig. 5b-c), due to the present soluble organic substances. Moreover, the  $R_{\text{irreversible}}/R_{\text{fouling}}$  of F5 was the highest among all examined fractions.

Therefore, it can be concluded interactions of algae cells, cell debris and EOM helped to increase the reversibility of fouling effects by reducing irreversible fouling; fouling effects could be mitigated as the filtration proceeded for all fractions; reversible fouling was more dominant with time, compared to irreversible fouling. The highest



**Fig. 5. Fractionated filtration of *Coelastrella* (C):** a: normalized permeate flux ( $J/J_0$ )-time profile; b: filtration resistance  $R_{\text{fouling}}$  split up to reversible ( $R_{\text{reversible}}$ ) and irreversible ( $R_{\text{irreversible}}$ ) resistance; c: percentage of  $R_{\text{irreversible}}$  in  $R_{\text{fouling}}$ . 100 mbar,  $J_0$ : 171.20  $\text{L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  (F1), 249.44  $\text{L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  (F2), 178.65  $\text{L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  (F3), 251.29  $\text{L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  (F5),  $c_x$ : 1.653  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (F1), 1.667  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (F3), CF: 2.695 (F1), 2.406 (F3), TOC: 32.3  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (F5),  $n = 1$ .



**Fig. 6.** Comparison of fouling resistance ( $R_{\text{fouling}}$ ) between *Coelastrella* (C) and *Desmodesmus* (D). a: original microalgal suspension; \*: no data available; b: supernatant; c: resuspension. 100 mbar;  $J_0$ : 171.20  $\text{L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  (F1 C), 129.07  $\text{L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  (F1 D), 249.44  $\text{L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  (F2 C), 168.90  $\text{L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  (F2 D), 178.65  $\text{L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  (F3 C), 191.46  $\text{L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  (F3 D), 251.29  $\text{L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  (F5);  $c_s$ : 1.653  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (F1 C), 1.532  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (F1 D), 1.667  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (F3 C), 1.351  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (F3 D); CF: 2.695 (F1 C), 1.424 (F1 D), 2.406 (F3 C), 2.377 (F3 D); TOC: 32.3  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (F5);  $n = 1$ .

fouling resistance ( $R_{\text{fouling}}$ ) was induced by the original algal suspension (F1) while irreversible fouling had a significant impact on the filtration of the effluent (F5).

### 3.2.2. Fractioned filtration of different algae solutions – Comparison across species

The filtration of *Desmodesmus* F1 showed a slightly higher fouling resistance  $R_{\text{fouling}}$  than *Coelastrella* F1 (Fig. 6a). The same behaviour was observed in the filtration of F2 (Fig. 6c). However, F3 of both species only showed minor differences in regard of  $R_{\text{fouling}}$  and  $R_{\text{irreversible}}$ . Although *Coelastrella* (spherical single cells) and *Desmodesmus* cells (stick-shaped, 4–8 cell agglomerates with flagellates) vary remarkably in morphological characteristics (Fig. 6b), the difference between species in terms of the fouling behaviour were not prominent. The results suggested that differences in the filterability of the original algal suspension can thereby be attributed to the different EOM content or compositions in F2. This confirms that EOM and other soluble substances exerted a more severe influence on membrane fouling than morphological properties.

### 3.2.3. Fouling contributed by the AnMBR effluent

The backwash efficiency (BWE) was calculated for the first three cycles in F4 and F3 (Table 2) and all five cycles in F5 (Table S4) to evaluate the fouling-impact of the AnMBR effluent. Percentage deviation between the fouling resistances ( $R_{\text{fouling}}$ ,  $R_{\text{reversible}}$  and  $R_{\text{irreversible}}$ ) of F3 and F4 (F4 as 100%) is also shown in Table 2. Between cycle 1 and 2, the lowest BWE of 53.43% was measurable for F5, whereas it varied between 62.35 and 76.17% in F3 and F4 of both species. For F2, the BWE of cycle 1–2 is 68.49% (*Coelastrella*) and 74.67% (*Desmodesmus*), respectively (Table S4). For all fractions (F2–F5), a higher flux recovery (equal to a better BWE) was measured between cycles 2–3 compared to 1–2. During cycle 4 to 6, the BWE of F3 of both species stabilized between 92.47 and 99.27% and between 88.89 and 100% for F5. Consistent with the results in section 3.2.1, the high BWEs after cycle 1–2 demonstrated the removal of nearly all fouling that was built-up within a filtration cycle. Thus, irreversible fouling was reduced along the filtration process for all fractions.

The results show a high fouling propensity of the AnMBR effluent (F5), which can possibly be explained by its left organic load (32.3  $\text{mg}_{\text{TOC}}\cdot\text{L}^{-1}$ ) [8]. Organic fouling is known to be caused by the deposition of proteins, polysaccharides, humic acids and other organic substances on the membrane. Even under sub-critical conditions, the build-up of a gel-layer can occur [38]. Therefore, a further reduction of the organic carbon content in the effluent is beneficial for the mitigation of membrane fouling in downstream processing.

The fouling resistances  $R_{\text{fouling}}$  and  $R_{\text{reversible}}$  of F3 were about 37–52% lower than F4 for both species (%R in Table 2). These differences can be attributed to the organic load of the effluent and hence reinforce the previous findings. Small molecules present in F4 and F5 cause irreversible fouling [23], which agrees with our results, as reversible fouling is reduced in F3, compared to F4 and F5. For *Desmodesmus*, irreversible fouling was more distinct in F4 than F3, corresponding to the BWE-values. This was expected, due to the profound fouling propensity of the fresh AnMBR effluent. Surprisingly, the irreversible fouling of *Coelastrella* F3 was higher than in that of its F4. Algal cells alone mostly cause reversible fouling (formation of a cake layer) [18], additional cell debris blocks and narrows pores resulting in irreversible fouling [39]. Due to a higher osmotic pressure in F3 than F4, an increased number of debris, possibly caused by cell rupture, might occur for *Coelastrella* resuspension (F3). A higher amount of cell debris could potentially explain the aggravated irreversibility of fouling effect of *Coelastrella* in F3, compared to F4. Differences in the structure and stability of the cell walls of both species might indicate a lower tendency of the *Desmodesmus* cells to rupture in DI water. Furthermore, it is known that cell surface characteristics can be changed by binding polymeric substances [18]. The hydrophobicity of the cell surface influences the interaction between cell and membrane [38] that lead to fouling. The *Coelastrella* cell surface might be attracted by substances present in the effluent. The interactions possibly changed the hydrophobicity and thereby reduced interactions with the membrane that led to a lower irreversibility of fouling. Further investigation is required to verify both theories.

### 3.2.4. Future perspective

In conclusion, although the fouling formation on membrane is a very complex process, our study has gained numeral take-home messages, which can be valuable feedback for algal cultivation. As EOM and cell debris, together with the organic compounds in WW, contributes substantially to the fouling effect, especially the irreversible fouling, a sufficient or even complete removal of organic load in WW before microalgal cultivation and a control of EOM production from microalgae can significantly reduce fouling propensity. Cell recycling has been shown to be an effective tool enhancing algae-based WW treatment by increasing the biomass concentration in the PBR. Considering the inhibitory effect of a cake layer against irreversible fouling, an augmented cell number can be beneficial for the filtration process, given

**Table 2**Backwash efficiency of F3 and F4 as well as percentage deviation (%R) of fouling resistances ( $R_{fouling}$ ,  $R_{reversible}$  and  $R_{irreversible}$ ) between F3 and F4 (F4 as 100%).

	Stage	Backwashing efficiency		% $R_{fouling}$	% $R_{reversible}$	% $R_{irreversible}$
<i>Coelastrella</i> -Resuspension	1–2	DI water (F3)	AnMBR effluent (F4)	52%	43%	159%
	2–3	68.49%	76.17%	46%	41%	613%
<i>Desmodesmus</i> -Resuspension	1–2	62.35%	62.18%	43%	37%	81%
	2–3	92.45%	85.00%	46%	47%	38%

that the cell concentration does not exceed the limit for a stable sub-critical filtration.

The presented process of WW remediation and coupled algae filtration is nevertheless not yet optimized. The constant-pressure filtration was driven above critical conditions (very high permeabilities in the beginning), which is known to cause severe fouling. Those conditions – chosen for the purpose of fouling investigation – must be improved for a realistic and efficient WW treatment process. Therefore, a pilot-scale filtration device (Harvester) has been developed, which is a scale-up of the presented Mini-Harvester. Studies for the characterization of its filtration performance as well as its energy demand have already been conducted [40].

### 3.3. Biomass analysis

#### 3.3.1. Macromolecular compositions and fatty acid profile of the biomass.

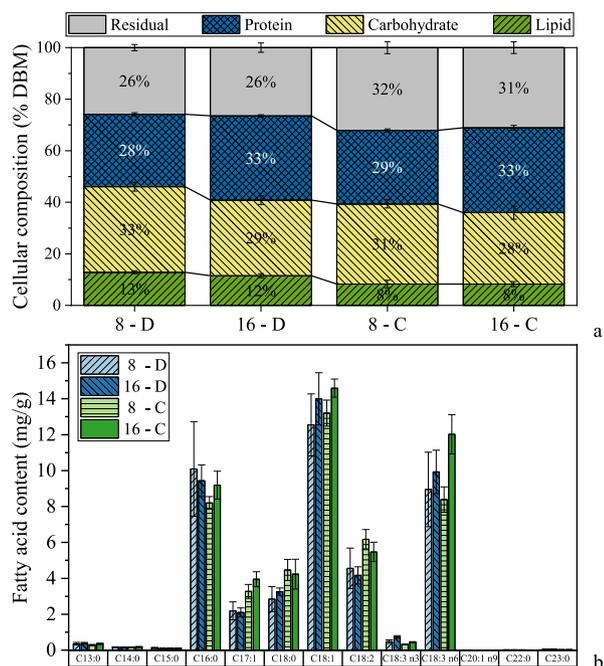
Fig. 7a displays the biochemical composition of the two species harvested at day 8 and day 16. Both species, showed very similar biochemical properties over semi-continuous cultivation. Although only marginal differences have been observed in protein and carbohydrate content between the two species at the same day, the total lipid content of *Desmodesmus* was higher than *Coelastrella* at day 8 and 16. It was reported that nitrogen limitation was followed by reduced biomass growth, but did not affect photosynthetic activities, resulting in the built-up of energy-rich storage components (starch and lipids) [41]. The

more severe depletion of N and P at day 8 led to a starch overproduction compared to day 16 for both species but did not yet trigger lipid production (Fig. 7a). Both species were characterized by relatively rich protein content at day 16, because of the higher bioavailability of N in the WW. Saturated fatty acids in both species remained the same between day 8 and 16 but monounsaturated and polyunsaturated fatty acids increased at day 16 compared to day 8 (Fig. 7b). This agreed with previous results that nutrients starvation can lead to reduced polyunsaturated fatty acid content in microalgae [24], which was caused by the more severe depletion of N and P source at day 8, as opposed to day 16.

#### 3.3.2. Elemental analysis and mass balance

Table 3 shows the content of the elements N, P and C of both algae species at day 8 and day 16. The N content in both species varied from 6.32 to 7.52% at day 8 and 16, while P content in *Desmodesmus* and *Coelastrella* at day 8 was 0.52% and 0.42%, respectively. Similar values have been reported from an analogous experiment revealing nitrogen content of 2.9–10.1%, while the phosphorus content varied between 0.5 and 1.7% for *Chlorella* and *Scenedesmus*. The differences in element contents can be attributed to varying nutrients availability in the used WW (10–50 mgN·L<sup>-1</sup>, 2–10 mgP·L<sup>-1</sup>) [10]. Higher nitrogen content in biomass was observed at day 16 than day 8, due to the higher N availability in the effluent. Based on the analytical results, a mass balance has been carried out to show the fate of N and P respectively (Table 3). The measured intracellular P content of 0.42–0.52% indicated around 80–96% of the P from the WW was incorporated (Table 3). This underlined an efficient P uptake by microalgae. A discrepancy between the measured and theoretical N content was found in *Desmodesmus* and *Coelastrella* at both day 8 and 16. The gap between measured and theoretical N content demonstrated a nitrogen escape of approximately 24–40%, presumably due to evaporation of ammonium from the medium [10,29]. In comparison with similar research [8], there was 10% less biomass productivity and nutrient removal efficiency in the present setup. This might be explained by a control experiment where the AnMBR effluent without microalgae inoculum was kept in the bioreactor and nutrients were measured over the week. There was a loss of up to 9.3 mg·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N which can only be associated to evaporation from the photobioreactor. The carbon content in algal biomass was very stable, almost 50% over the whole experiment. It can be assumed that the majority of the carbon derives from CO<sub>2</sub>, as the amount of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.2 g·L<sup>-1</sup>) added per liter of media to balance the pH is negligible. Approximately, 1.8 kg CO<sub>2</sub> can be fixed by producing 1 kg of dry biomass from atmosphere. Therefore, the average biomass yield of 0.162–0.168 g·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> over the semi-continuous cultivation can lead to a CO<sub>2</sub> sequestration rate of 0.292–0.302 gCO<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>.

To extend the spectrum of applications of the biomass, metals, especially heavy metals, have been quantified (Table 4). Heavy metals such as Co and Ni in the harvested biomass remained in very low concentrations while Al, Cd and Cu were not detected. The levels of heavy metals, except Pb, detected in the algae biomass were far below thresholds in regulations set aside by the European Food Safety Authority (EFSA). The EFSA (Commission Regulation (EC) No 1881/2006) threshold states Pb consumption should not be >25 µg·kg<sup>-1</sup> biomass per week. Thus, *Desmodesmus* and *Coelastrella* with Pb concentration of 3.31



**Fig. 7.** The macromolecular composition (a) and fatty acid profile (b) of *Desmodesmus* sp. and *Coelastrella* sp. biomass grown in AnMBR effluent. 8 - D and 16 - D stand for *Desmodesmus* sp. biomass harvested at day 8 and 16, respectively; 8 - C and 16 - C stand for *Coelastrella* sp. biomass at day 8 and 16, respectively. Results are displayed as mean  $\pm$  SD (n = 3).

**Table 3**  
Major elements (N, P and C) content in microalgal biomass.

Strain	Day	N <sub>Measured</sub> (%)	N <sub>Theoretical</sub> (%)	P <sub>Measured</sub> (%)	P <sub>Theoretical</sub> (%)	C <sub>Measured</sub> (%)
<i>Desmodesmus</i>	8	6.32 ± 0.17	10.6	0.52 ± 0.01	0.54	48.67
	16	7.36 ± 0.13	11.3	–	–	49.23
<i>Coelastrrella</i>	8	6.43 ± 0.15	9.6	0.42 ± 0.01	0.53	49.03
	16	7.42 ± 0.25	9.7	–	–	49.72

Results are displayed as mean ± SD (n = 3).

**Table 4**  
Heavy metal analysis for *Desmodesmus* and *Coelastrrella* biomass at day 8.

Strain	Co	Ni	Rb	Sr	Ba	Pb
<i>Desmodesmus</i> (ppm or mg·kg <sup>-1</sup> )	0.66	1.18 ± 0.47	2.82 ± 0.93	1.94 ± 0.61	2.58 ± 1.45	3.31 ± 0.88
	0.22	0.47	0.93	0.61	1.45	0.88
<i>Coelastrrella</i> (ppm or mg·kg <sup>-1</sup> )	0.44	0.62 ± 0.03	2.32 ± 0.15	1.58 ± 0.10	1.43 ± 0.79	0.70 ± 0.13
	0.07	0.03	0.15	0.10	0.79	0.13
Calculated	1.45	11.67 ± 2.80	50.81 ± 19.84	119.97 ± 43.01	23.93 ± 4.69	1.18 ± 0.31
AnMBR effluent (ppb or µg/kg)	0.30	2.80	19.84	43.01	4.69	0.31
Limit of quantification (ppb or µg/kg)	29.6	50.5	121.1	35.7	24.7	3

“< LOQ” stands for “below limit of quantification”. Four replicates were performed for *Desmodesmus* and AnMBR effluent, while duplicates for *Coelastrrella*. Results are displayed as mean ± SD.

and 0.70 mgPb·kgBiomass<sup>-1</sup>, respectively, cannot be directly used as feeds but can be used as feed supplement for cattle when mixed with other feed. Nevertheless, the biomass can also be used to produce bio-fuels and biochemicals. The toxic heavy metals concentration in liquid AnMBR effluent were all below the limit of quantification of our method. Therefore, the metals in the lyophilized AnMBR effluent powder were directly quantified before dilution (dilution rate: 1 g powder/1 L DI water). As expected, the obtained values thereby were orders of magnitude higher compared to the liquid effluent and subsequently converted to the concentration of metals in the AnMBR effluent, as shown in Table 4. The results confirmed that Co, Ni and Pb were present in low concentrations in the effluent at a level of ppb or µg·kg<sup>-1</sup>. Comparisons have been made between the Co, Ni and Pb content in AnMBR effluent and algae biomass, indicating that both species incorporated parts of the metals from the effluent. However, Pb in *Desmodesmus* was higher than that in the AnMBR effluent, presumably due to bioaccumulation of Pb from previous cultivation or an introduction of Pb from other origins during the process, as the Pb in AnMBR effluent was low [42,43]. Therefore, it can be inferred that metal content in algae, especially in *Desmodesmus* biomass, should be monitored on a regular basis before the recycling biomass and fresh inoculum should be used to obtain biomass of high quality when heavy metal contents are above the corresponding thresholds. Hence the biomass grown from the applied WW, characterized by relatively high protein and carbohydrate content but low heavy metal content, can be potentially used as feed additive for livestock farming as well as bioenergy sources to offset the cost of water treatment [44].

#### 4. Conclusions

Conclusions can be drawn that nutrients (N and P) can be efficiently removed by microalgae from AnMBR effluent but a more balanced nutrients composition can benefit the biomass productivity. The filtration data showed the AnMBR effluent alone, containing organic carbon, contributed significantly to membrane fouling. The cumulative effect of algae cells, cell debris as well as EOM present in the original algae suspension created the highest measurable fouling resistance.

Supernatant with EOM changed the fouling behavior more significantly than algal morphological properties. For all fractions, irreversible fouling was dominant at the beginning of a filtration process, when clean membrane was initially exposed to microalgal suspension. The present results help to unravel the complex mechanism of fouling formation caused by filtration of microalgae grown from WW. To minimize biofouling, TOC in WW needs to be completely removed before cultivation and EOM should be controlled during algal cultivation. Irreversible fouling only occurred at the beginning of the filtration process. Later on, reversible fouling can be controlled by backflushing and aeration. Thus, the current membrane can be proposed for long-term filtration. The rich protein, PUFA, but low heavy metal content in the biomass indicates overall cost of WW treatment can be partially offset by the valorization of biomass. In this study, WW treatment in upstream and filtration in downstream were coupled to elucidate the fouling mechanism formed by WW-based microalgae suspension.

#### CRedit authorship contribution statement

**Song Wang:** Conceptualization, Investigation, Writing – original draft, Visualization. **Franziska Ortiz Tena:** Conceptualization, Investigation, Writing – original draft, Visualization. **Rohit Dey:** Writing – review & editing, Validation, Investigation. **Claudia Thomsen:** Conceptualization, Validation, Writing – review & editing. **Christian Steinweg:** . **Dennis Kraemer:** . **Amit Dan Grossman:** . **Yonas Zeslase Belete:** Writing – review & editing. **Roy Bernstein:** Writing – review & editing. **Amit Gross:** Conceptualization, Supervision. **Stefan Leu:** Conceptualization, Supervision. **Sammy Boussiba:** Conceptualization, Supervision. **Laurenz Thomsen:** Conceptualization, Validation. **Clemens Posten:** Conceptualization, Validation.

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgements

This work was supported by the AnMBRA (Anaerobic Membrane BioReactor and Algae production for Industrial Wastewater Recycling) project (WT1605/02WIL1455A, 02WIL 1455B, 01/07/2017 to 31/12/2021). The AnMBRA project was funded by the German–Israeli Water Technology Cooperation by Israeli Ministry of Science and Technology and German Federal Ministry of Education and Research.

#### Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2022.120744>.

#### References

- [1] A.L. Gonçalves, J.C. Pires, M. Simões, A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment, *Algal Res.* 24 (2017) 403–415, <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.11.008>.
- [2] W. Unesco, *The untapped resource*, UNESCO, Paris, 2017.

- [3] J.-H. Wang, T.-Y. Zhang, G.-H. Dao, X.-Q. Xu, X.-X. Wang, H.-Y. Hu, Microalgae-based advanced municipal wastewater treatment for reuse in water bodies, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101 (7) (2017) 2659–2675, <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8184-x>.
- [4] D.L. Sutherland, P.J. Ralph, Microalgal bioremediation of emerging contaminants - Opportunities and challenges, *Water Res.* 164 (2019), 114921, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.114921>.
- [5] M. Sacristán de Alva, V.M. Luna-Pabello, E. Cadena, E. Ortíz, Green microalga *Scenedesmus acutus* grown on municipal wastewater to couple nutrient removal with lipid accumulation for biodiesel production, *Bioresour. Technol.* 146 (2013) 744–748, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.061>.
- [6] R. Kothari, V.V. Pathak, V. Kumar, D.P. Singh, Experimental study for growth potential of unicellular alga *Chlorella pyrenoidosa* on dairy waste water: an integrated approach for treatment and biofuel production, *Bioresour. Technol.* 116 (2012) 466–470, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.03.121>.
- [7] A.C. Oliveira, A. Barata, A.P. Batista, L. Gouveia, *Scenedesmus obliquus* in poultry wastewater bioremediation, *Environ. Technol.* 40 (28) (2019) 3735–3744, <https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1488003>.
- [8] A.D. Grossman, Y.Z. Belete, S. Boussiba, U. Yogev, C. Posten, F. Ortíz Tena, L. Thomsen, S. Wang, A. Gross, S. Leu, R. Bernstein, Advanced near-zero waste treatment of food processing wastewater with water, carbon, and nutrient recovery, *Sci. Total Environ.* 779 (2021).
- [9] E.-S. Salama, M.B. Kurade, R.A. Abou-Shanab, M.M. El-Dalatony, I.-S. Yang, B. Min, B.-H. Jeon, Recent progress in microalgal biomass production coupled with wastewater treatment for biofuel generation, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 79 (2017) 1189–1211, <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.091>.
- [10] A. Beuckels, E. Smolders, K. Muylaert, Nitrogen availability influences phosphorus removal in microalgae-based wastewater treatment, *Water Res.* 77 (2015) 98–106, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.03.018>.
- [11] E. Monfet, A. Unc, Defining wastewaters used for cultivation of algae, *Algal Research* 24 (2017) 520–526, <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.12.008>.
- [12] K.W. Chew, J.Y. Yap, P.L. Show, N.H. Suan, J.C. Juan, T.C. Ling, D.-J. Lee, J.-S. Chang, Microalgae biorefinery: High value products perspectives, *Bioresour. Technol.* 229 (2017) 53–62, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.006>.
- [13] Y.K. Leong, J.-S. Chang, Bioremediation of heavy metals using microalgae: Recent advances and mechanisms, *Bioresour. Technol.* 303 (2020) 122886, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122886>.
- [14] E. Molina Grima, E.-H. Belarbi, F. Acíen Fernández, A. Robles Medina, Y. Chisti, Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics, *Biotechnol. Adv.* 20 (2003) 491–515, [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(02\)00050-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00050-2).
- [15] G. Singh, S.K. Patidar, Microalgae harvesting techniques: A review, *J. Environ. Manage.* 217 (2018) 499–508, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.04.010>.
- [16] N. Uduman, Y. Qi, M.K. Danquah, G.M. Forde, A. Hoadley, Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels, *J. Renewable Sustainable Energy* 2 (1) (2010) 012701, <https://doi.org/10.1063/1.3294480>.
- [17] Y. Liao, A. Bokhary, E. Maleki, B. Liao, A review of membrane fouling and its control in algal-related membrane processes, *Bioresour. Technol.* 264 (2018) 343–358, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.102>.
- [18] Y. Zhang, Q. Fu, Algal fouling of microfiltration and ultrafiltration membranes and control strategies: A review, *Sep. Purif. Technol.* 203 (2018) 193–208, <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.04.040>.
- [19] E. Kanchanapit, B.-R. Su, S. Tulaphol, W. Den, N. Gridsanurak, C.-C. Kuo, Fouling characterization and control for harvesting microalgae *Arthrospira* (Spirulina) maxima using a submerged, disc-type ultrafiltration membrane, *Bioresour. Technol.* 209 (2016) 23–30, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.081>.
- [20] R.W. Field, D. Wu, J.A. Howell, B.B. Gupta, Critical flux concept for microfiltration fouling, *J. Membr. Sci.* 100 (3) (1995) 259–272, [https://doi.org/10.1016/0376-7388\(94\)00265-Z](https://doi.org/10.1016/0376-7388(94)00265-Z).
- [21] A. Massé, O. Arab, V. Séchet, P. Jaouen, M. Pontié, N.-E. Sabiri, S. Plantier, Performances of dead-end ultrafiltration of seawater: From the filtration and backwash efficiencies to the membrane fouling mechanisms, *Sep. Purif. Technol.* 156 (2015) 512–521, <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.10.044>.
- [22] M. Rezakazemi, A. Dashti, H. Riasat Harami, N. Hajilari, Inamuddin, Inamuddin Fouling-resistant membranes for water reuse, *Environ. Chem. Lett.* 16 (3) (2018) 715–763, <https://doi.org/10.1007/s10311-018-0717-8>.
- [23] X. Zhang, Q. Hu, M. Sommerfeld, E. Puruhito, Y. Chen, Harvesting algal biomass for biofuels using ultrafiltration membranes, *Bioresour. Technol.* 101 (14) (2010) 5297–5304, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.007>.
- [24] S. Wang, D. Sirbu, L. Thomsen, N. Kuhnert, M.S. Ullrich, C. Thomsen, Y. Li, Comparative lipidomic studies of *Scenedesmus* sp. (Chlorophyceae) and *Cylindrotheca closterium* (Bacillariophyceae) reveal their differences in lipid production under nitrogen starvation, *J. Phycol.* 55 (6) (2019) 1246–1257, <https://doi.org/10.1111/jpy.12887>.
- [25] C.V. González López, M.D.C.C. García, F.G.A. Fernández, C.S. Bustos, Y. Chisti, J. M.F. Sevilla, Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass, *Bioresour. Technol.* 101 (19) (2010) 7587–7591, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.077>.
- [26] A.-L. Zocher, F. Klimpel, D. Kraemer, M. Bau, Assessing the bioavailability of dissolved rare earths and other trace elements: digestion experiments with aquatic plant species *Lemna minor* (“duckweed” reference standard BCR-670), *Appl. Geochem.* (2021), 105025, <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2021.105025>.
- [27] Y. Luo, P. Le-Clech, R.K. Henderson, Simultaneous microalgae cultivation and wastewater treatment in submerged membrane photobioreactors: A review, *Algal Res.* 24 (2017) 425–437, <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.10.026>.
- [28] W. Wu, X. Zhang, L. Qin, X. Li, Q. Meng, C. Shen, G. Zhang, Enhanced MPBR with polyvinylpyrrolidone-graphene oxide/PVDF hollow fiber membrane for efficient ammonia nitrogen wastewater treatment and high-density *Chlorella* cultivation, *Chem. Eng. J.* 379 (2020), 122368, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.122368>.
- [29] N.C. Boelee, H. Temmink, M. Janssen, C.J.N. Buisman, R.H. Wijffels, Nitrogen and phosphorus removal from municipal wastewater effluent using microalgal biofilms, *Water Res.* 45 (18) (2011) 5925–5933, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.08.044>.
- [30] T. Tang, Z. Hu, A comparison of algal productivity and nutrient removal capacity between algal CSTR and algal MBR at the same light level under practical and optimal conditions, *Ecol. Eng.* 93 (2016) 66–72, <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.04.008>.
- [31] A. Ruiz-Martínez, J. Serralta, I. Romero, A. Seco, J. Ferrer, Effect of intracellular P content on phosphate removal in *Scenedesmus* sp. Experimental study and kinetic expression, *Bioresour. Technol.* 175 (2015) 325–332, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.081>.
- [32] A.E. Solovchenko, T.T. Ismagulova, A.A. Lukyanov, S.G. Vasilieva, I.V. Konyukhov, S.I. Pogosyan, E.S. Lobakova, O.A. Gorelova, Luxury phosphorus uptake in microalgae, *J. Appl. Phycol.* 31 (5) (2019) 2755–2770, <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01831-8>.
- [33] A.C. Redfield, The biological control of chemical factors in the environment, *Sci. Prog.* 11 (1960) 150–170.
- [34] R. Geider, J. La Roche, Redfield revisited: variability of C:N: P in marine microalgae and its biochemical basis, *Eur. J. Phycol.* 37 (2002) 1–17, <https://doi.org/10.1017/S0967026201003456>.
- [35] P. Bacchin, P. Aïmar, R. Field, Critical and sustainable fluxes: Theory, experiments and applications, *J. Membr. Sci.* 281 (1–2) (2006) 42–69, <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2006.04.014>.
- [36] L. Song, Flux decline in crossflow microfiltration and ultrafiltration: mechanisms and modeling of membrane fouling, *J. Membr. Sci.* 139 (1998) 183–200, [https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(97\)00263-9](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(97)00263-9).
- [37] P. Le-Clech, V. Chen, T.A.G. Fane, Fouling in membrane bioreactors used in wastewater treatment, *J. Membr. Sci.* 284 (1–2) (2006) 17–53, <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2006.08.019>.
- [38] Z. Wang, J. Ma, C.Y. Tang, K. Kimura, Q. Wang, X. Han, Membrane cleaning in membrane bioreactors: A review, *J. Membr. Sci.* 468 (2014) 276–307, <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2014.05.060>.
- [39] F. Qu, H. Liang, J. Tian, H. Yu, Z. Chen, G. Li, Ultrafiltration (UF) membrane fouling caused by cyanobacteria: Fouling effects of cells and extracellular organics matter (EOM), *Desalination* 293 (2012) 30–37, <https://doi.org/10.1016/j.desal.2012.02.020>.
- [40] F. Ortiz Tena, K. Ranglová, D. Kubač, C. Steinweg, C. Thomson, J. Masojidek, C. Posten, Characterization of an aerated submerged hollow fiber ultrafiltration device for efficient microalgae harvesting, *Eng. Life Sci.* 21 (10) (2021) 607–622, <https://doi.org/10.1002/elsc.202100052>.
- [41] G. Procházková, I. Brányiková, V. Zachleder, T. Brányik, Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae, *J. Appl. Phycol.* 26 (3) (2014) 1359–1377, <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0154-9>.
- [42] B. Debelius, J.M. Forja, Á. DelValls, L.M. Lubián, Toxicity and bioaccumulation of copper and lead in five marine microalgae, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72 (5) (2009) 1503–1513, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.04.006>.
- [43] Angga Puja Asiantu, Agus Wahyudi, Phycoremediation: Heavy Metals Green-Removal by Microalgae and Its Application in Biofuel Production, *1 9* (2021) 647–656. [10.47277/JETT/9\(3\)647](https://doi.org/10.47277/JETT/9(3)647).
- [44] C. Safi, B. Zebib, O. Merah, P.-Y. Pontalier, C. Vaca-García, Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 35 (2014) 265–278, <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>.

## 7.4 Exploring advanced phycoremediation strategies for nutrient recovery from a secondary wastewater source using a largescale membrane photobioreactor system

**DOI:** 10.1016/j.biortech.2023.129986

**Journal:** Bioresource Technology, 2023, 129986

**Autoren:** Rohit Dey, Franziska Ortiz Tena, Song Wang, Josef Martin Messmann, Christian Steinweg, Claudia Thomsen, Clemens Posten, Stefan Leu, Matthias S. Ullrich, Laurenz Thomsen

### Zusammenfassung

Die vorliegende Veröffentlichung fasst die Ergebnisse einer kontinuierlichen Abwasseraufbereitung in einem 1000 L-Membran-Photobioreaktor in einem Gewächshaus im Außenbereich mit der Mikroalge *Desmodesmus* sp. zusammen. Die Grünalge wurde aus einer Kläranlage in Deutschland isoliert. Die Experimente wurden im Sommer und Winter durchgeführt, um den Einfluss verschiedener klimatischer Einflussfaktoren auf den Abwasserreinigungsprozess zu verstehen. Unter Lichtlimitierung konnte eine Reduktion der Biomassekonzentration im Photobioreaktor eine verbesserte Nährstoffaufnahme bewirken. Die Rückführung von Zellen in den PBR war bei hohen Lichtintensitäten eine effektive Maßnahme zur Steigerung der Reinigungseffizienz des Abwassers. Im Vergleich zu einer konventionellen kontinuierlichen Kultivierung konnten die Anwendung der Zellrückführung in Kombination mit hohen Verdünnungsraten bei hoher Lichtverfügbarkeit (Sommer) sowie die Reduktion der Biomassekonzentration und der Verdünnungsrate bei geringer Lichtverfügbarkeit (Winter) die Biomasseproduktivität im Sommer und Winter um 80 % bzw. 10 % steigern. Darüber hinaus waren verbesserten Nährstoffaufnahme um 23 % (Stickstoff und Phosphor) im Winter nachweisbar, wohingegen sie im Sommer unverändert blieb.



## Exploring advanced phycoremediation strategies for resource recovery from secondary wastewater using a large scale photobioreactor

Rohit Dey<sup>a,\*</sup>, Franziska Ortiz Tena<sup>b</sup>, Song Wang<sup>c</sup>, Josef Martin Messmann<sup>d</sup>, Christian Steinweg<sup>b</sup>, Claudia Thomsen<sup>e</sup>, Clemens Posten<sup>b</sup>, Stefan Leu<sup>f</sup>, Matthias S. Ullrich<sup>a</sup>, Laurenz Thomsen<sup>a,g</sup>

<sup>a</sup> School of Science, Constructor University Bremen, Germany

<sup>b</sup> Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Germany

<sup>c</sup> College of Life Sciences and Oceanography, Shenzhen University, China

<sup>d</sup> Laboratory Services, Constructor University, Germany

<sup>e</sup> iSeaMC GmbH, Bremen, Germany

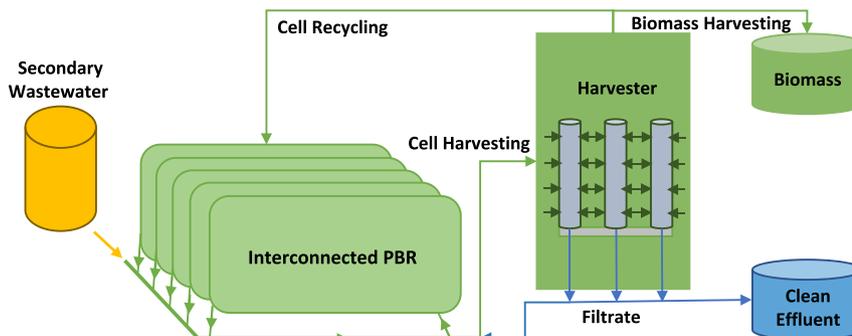
<sup>f</sup> Ben-Gurion University of the Negev, Israel

<sup>g</sup> University of Gothenburg, Department of Marine Sciences Sweden

### HIGHLIGHTS

- Cell recycling during high light intensity increases wastewater treatment efficiency.
- Cell cycling during yearlong operations boost overall biomass productivity.
- Lower cell densities during low light intensity prevents drop in wastewater treatment efficiency.
- Membrane photobioreactor systems can be used for yearlong phycoremediation.

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Membrane photobioreactor  
Microalgae  
Cultivation  
Outdoor  
Large-scale

### ABSTRACT

This study aimed to investigate the operation of a 1000L microalgae-based membrane photobioreactor system in a greenhouse for continuous secondary wastewater treatment using *Desmodesmus sp.*, a green microalgae strain originally isolated from a German sewage plant. The research spanned both summer and winter seasons, seeking to comprehend key trends and optimization strategies. Maintaining low cell concentrations in the photobioreactor during periods of light inhibition proved advantageous for nutrient uptake rates. Effective strategies for enhancing algae-based wastewater treatment included cell mass recycling, particularly during periods of high light availability. In comparison to conventional continuous cultivation methods, employing cell recycling and high dilution rates during times of abundant light, alongside using low cell concentrations and dilution rates during light inhibition, resulted in an 80 % and 10 % increase in overall biomass productivity during summer and

\* Corresponding author at: Constructor University Bremen, Campus Ring 1, Bremen 28759, Germany.

E-mail address: [r.dey@jacobs-university.de](mailto:r.dey@jacobs-university.de) (R. Dey).

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129986>

Received 4 July 2023; Received in revised form 27 October 2023; Accepted 3 November 2023

Available online 4 November 2023

0960-8524/© 2023 Elsevier Ltd. All rights reserved.

winter, respectively. Furthermore, nitrogen/phosphorus (N/P) removal rates exhibited a 23 % improvement during winter, while remaining unchanged in summer.

## 1. Introduction

For nearly a century, humans have sought to industrialize microalgae due to their ability to use carbon dioxide as a carbon source and wastewater components as nutrients while producing biomass. This biomass can be used for various high and low-value products, including health products, pharma- and nutraceuticals, pigments, animal feeds, and biofuel, reducing reliance on non-renewable sources (Chisti, 2007; Mata et al., 2010; Gonçalves et al., 2017). However, large-scale biomass production at low costs is necessary for global commercial viability. Small to medium-scale microalgae plants often have higher manufacturing costs than non-algae-based alternatives (Hunter et al., 2019; Li et al., 2020). Major cost factors include energy for illumination and efficient separation from growth media. Microalgal plants are more energy-efficient in areas with intense sunlight, but overheating can inhibit growth, requiring additional energy for cooling or employing less efficient raceway technology (Goswami et al., 2022).

Two common microalgae cultivation systems are open raceway ponds and closed photobioreactors (PBRs). Open ponds are preferred for full-scale cultivation due to simplicity, low capital, and operational costs. However, they are sensitive to contamination, have limited control over the growth conditions, and low light penetration, leading to lower biomass productivity and higher harvesting costs. High-rate algal pond systems can achieve a maximum of 20 g/m<sup>2</sup>/d biomass productivity under natural sunlight. Higher values are possible with advanced PBR systems, artificial light, and CO<sub>2</sub> injection (Kim et al., 2018; Nagarajan et al., 2020). Closed PBRs are more contamination-resistant and have better volumetric productivity but are more complex and costly, making only continuous PBR systems economically viable. The problem here that needs to be addressed is the so-called “washout” problem during continuous cultivations. The balance between steadily providing nutrients to the biomass without losing biomass by diluting the culture too much is tricky and will change with given conditions like light and nutrient availability (Nagarajan et al., 2020). High dilution rates increase nutrient supply but decrease algal productivity in large-scale wastewater treatment (WWT) systems, requiring 99 % dewatering before biomass use, increasing energy consumption (Bilad et al., 2014; Nagarajan et al., 2020). A solution is coupling PBRs with membrane-based cell retention systems, creating membrane photobioreactor (MPBR) systems (Marbelia et al., 2014). In MPBRs, algae cells are retained while media is filtered, preventing “washout” and increasing biomass concentration. Biomass concentration can be controlled by recycling filtered biomass (retentate) and media (filtrate). After initial failures due to cell flocculation and settling, Honda et al. (2012) successfully combined submerged membrane filtration in a photobioreactor using synthetic sewage as feed, capturing CO<sub>2</sub> while maintaining high volumetric microalgal productivity and concentration. However, large-scale outdoor applications have not been reported (Ortiz Tena et al., 2020; Wang et al., 2022).

Wastewater (WW) is an important energy and nutrient recoverable resource. Established WWT technologies, like activated sludge, are energy-intensive and lack nutrient recovery infrastructure. Anaerobic membrane bioreactors (AnMBRs) are a green alternative for organic matter decomposition and energy recovery, with positive energy balances reported for urban and industrial wastewater treatment (Maaz et al., 2019; Robles et al., 2020; Grossman et al., 2021). However, AnMBR is a primary WWT technology, releasing N and P-rich water requiring secondary treatment. Studies have attempted to grow microalgae in secondary wastewaters, balancing AnMBR WWT costs by recovering high-value nutrients using cost-effective green secondary treatment (Grossman et al., 2021; Wang et al., 2022), but large-scale

outdoor applications are lacking. In this study, the aim was to use a MPBR system to continuously treat secondary wastewater (primary AnMBR treated) in a 1,000-L PBR system with *Desmodesmus* sp. (KY302863), isolated from a German municipal sewage plant (Han et al., 2019). System efficiency was compared under varying weather conditions and optimized for year-round cultivation. A synthetic version of the original AnMBR wastewater (Grossman et al., 2021) was used to prevent long distance transport of the waste-water and reduce the chances of any chemical changes in the water during long term storage. Previous studies showed that removing organic carbon from WW minimizes fouling in the long term (Wang et al., 2022). Tests were conducted in a Constructor University greenhouse in Bremen, Germany, using natural sunlight. WW treatment performance was evaluated by measuring nutrient removal rates, reduction percentages, and biomass productivities over multiple growth cycles in batch and continuous mode in summer and winter. Special attention was paid to optimizing ideal biomass concentrations for efficient WWT under different light conditions. Macromolecular and elemental composition of harvested biomass was analysed to deduce final fate of the nutrients.

## 2. Materials and method

### 2.1. Microalgae, growth medium and stock cultivation

*Desmodesmus* sp. (KY302863), isolated from a German sewage plant (Han et al., 2019), was used to treat synthetic secondary WW. The primary WW, originating from an Israeli potato chips factory, underwent AnMBR treatment at Ben-Gurion University, removing organic carbon while retaining phosphorus and nitrogen (secondary WW) (Grossman et al., 2021). A synthetic version (synthetic AnMBR effluent) was created by adding NH<sub>4</sub>Cl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, A5 micro-nutrients, Fe-EDTA, and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH buffer to tap water (N and P levels of the tap water were below 0.05 mg/L) based on Wang et al. (2022). *Desmodesmus* sp. (KY302863) was chosen for its adaptability and nutrient stress resistance (Ji et al., 2014; Han et al., 2019; Wang et al., 2022). The WW was selected because it is an emerging type of secondary WW that the global food industry is trying to recover nutrients prior to discharging in order to work towards a circular economy (Abuabdou et al., 2020; Kong et al., 2022; Mahmood, Cheng and Tian, 2022). *Desmodesmus* sp. stock cultures grown in Bold's Basal Medium were cultivated in 2-L bottle PBRs (diameter: 9 cm, filling height: 15 cm) with synthetic AnMBR effluent. Cultures grew at 24 ± 1 °C, under 14 h/10 h light/darkness (200 µE/m<sup>2</sup>/s, fluorescent tube lights). pH was 7.0–8.1, maintained by CO<sub>2</sub> injection; aeration was continuous with an aquarium air compressor 230 V, 50 Hz, 130 W (LA-120-A1108-P3-1413, Nitto Kohki, Germany). Initial NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N and TP in the effluent were 100 mg N/L and 10 mg P/L. This culture (2 L each) was inoculated into three 10-L phytobag PBRs (Phytolutions GmbH, Bremen, Germany) as the starter culture for the pilot plant with continuous 30 L/min air supply through a tube and lit by 58 W fluorescence lamps (Osram, Munich, Germany) at 75 µmol/m<sup>2</sup>/s. Similar conditions were used to cultivate 120L of starter culture. For further details about the lab scale studies please refer to Wang et al., 2022.

### 2.2. Photobioreactor (PBR)

The PBR comprised four major components outlined in Wang et al. (2018) (Fig. 1A): five polyethylene phytobags (5-meter long and 1.5-meter high, volume 200 L each spaced equidistantly over an efficient ground area of 25 m<sup>2</sup>) connected to a circulation system driven by a peristaltic pump (Axflow, London, United Kingdom). An indoor water tank acted as a thermal conductor, maintaining PBR temperature

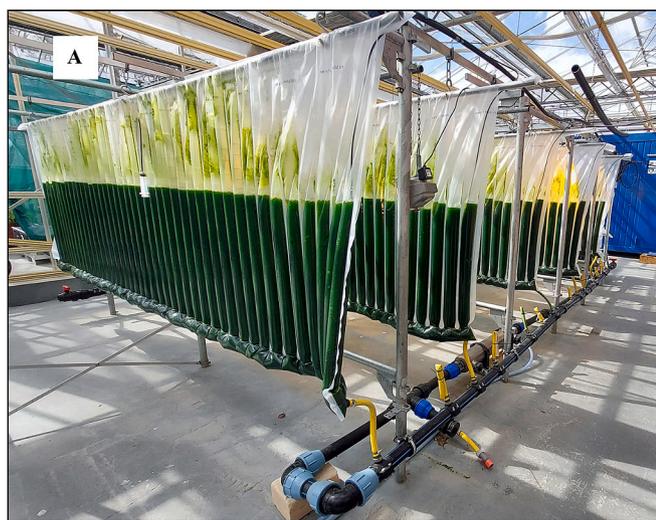
(18–25 °C) via a titanium heat sink. Aeration utilized micro-bubble air tubes, CO<sub>2</sub> was controlled by a valve linked to a pH sensor (Conrad, Germany) and cell densities were monitored by a turbidity sensor (Turbimax, Endress Hauser, Germany). A water level sensor maintained the reactor volume via synthetic AnMBR effluent addition. Situated at Constructor University, Bremen, Germany, (53°9'53" N, 8°39'1" E) the pilot plant experienced varying environmental conditions due to seasonal changes. *Desmodesmus* sp. was batch cultivated (1000 L) in April (Summer) and December (Winter) with daily growth kinetics monitoring.

### 2.3. Ultrafiltration device (Harvester)

The filtration device *Harvester* (Fig. 1B) was developed at the Karlsruhe Institute of Technology, Germany, described by Ortiz Tena et al., 2021. Utilizing a commercial membrane module (Puron Hollow Fiber Rows® manufactured by Koch Membrane Systems), it achieves low-fouling microalgae filtration with minimal energy use. Peristaltic pumps control inflow (microalgae solution) and outflow (filtered solution) to/from the Harvester. Recycling or complete removal of retentate is possible. Filtrate flux relies on monitored transmembrane pressure by a vacuum pump. Fluxes, temperature, and turbidity are recorded online. Continuous aeration (bubbling) curbs membrane fouling. Component details are in Ortiz Tena et al., 2021.

### 2.4. Batch phase monitoring in PBR

The stock species (120L) cultured in *phytobags* were inoculated in the PBR with the synthetic AnMBR media for a total volume of 1000 L and maintained as a batch culture to prepare the PBR for the continuous cultivation phase next (Fig. 1A). The starting biomass concentration in the bioreactors was  $0.077 \pm 0.020$  g/L in summer and  $0.055 \pm 0.020$  g/L in winter. After analysis of the data collected from the batch phase operations in summer, the total NH<sub>4</sub>-N in the synthetic wastewater had to be increased to 150 mgN/L to ensure complete nutrient removal (further explained in section 3.1). Average sunlight reaching the bag reactors inside the greenhouse during the hours of sunlight was measured to be  $200 \pm 200$   $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  in the summer (April-June) and  $95 \pm 100$   $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  during the winter (December-February) measured perpendicular to the PBR surface using a mini-PAM (Walz MINI-PAM-II). Thus, the actual light availability per cell was not enough to trigger detectable photosynthetic activity on days the light reaching the PBR surface was less than  $95$   $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ . Hence, fluorescent light had to be supplemented between 30 and 50 % of the available daylight hours (specially on rainy and cloudy days) so the minimum light actually reaching the bioreactor was at least  $100$   $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  (Maltsev et al., 2021). Average available sunlight hours were 12 h in summer and 6–8 h in winter and remained so during the experiments. Biomass was collected daily at 12 noon from different locations of the reactor to monitor OD,



**Fig. 1.** A. *Desmodesmus* sp. cultivation and waste-water (WW) treatment in interconnected photobioreactor (PBR) system. Each PBR “bag” has a total capacity of 200L and is continuously circulated with a peristaltic pump through the entire 1000L volume of the system. Air is pumped through a porous tube running along the inside bottom of each bag that provides bubbling for mixing and gas exchange. Light is provided from natural sunlight with extra artificial light near shaded areas. Samples collected from the middle of each bag daily using a tube connected to a syringe. B: The *Harvester* comprising of mainly the separating chamber with hollow fiber bundles in the middle separates the algae from the WW and multiple peristaltic pumps connected to the harvester ensure their independent separation and flow rate control which allows them to be independently removed or returned to the PBR depending on the readings measured by the sensors.

dry biomass, and nutrient levels in the media.

### 2.5. Continuous cultivation using MPBR coupled system

The microalgae were cultivated in synthetic AnMBR effluent until nutrients were consumed. Continuous cultivation began in summer (May-July) using a LabVIEW-based process control system for automated filtration and cell recycling in the PBR. Equations and process handling were sourced from Ortiz Tena et al., 2021. A constant dilution rate of 0.3 per day was maintained in the PBR, with two strategies employed. This rate represents average summer growth rates. Due to large wastewater volumes, culture homogenization takes time when fresh effluent is added. Thus, cell concentrations and total system volume must be constantly monitored.

In stage 1 (S1), the autonomous handler kept algae concentration in the PBR at the density reached at the end of the batch phase, maintaining a constant dilution rate of 0.3 per day in summer and 0.2 per day in winter. Turbidity sensors monitored biomass concentration. When the pre-set threshold was crossed, the ultrafiltration unit harvested cells from the PBR at a dilution rate of 0.3 per day. A water level sensor detected volume reduction and pumped fresh synthetic AnMBR effluent into the PBR. Continuous cultivation paused at night. S1 lasted seven days, with data recorded. Half the PBR volume was replaced with synthetic AnMBR effluent for microalgae to reach stationary conditions, repeated twice for triplicate values. In stage 2 (S2), the autonomous handler removed filtered clean water from the PBR at a dilution rate of 0.3 per day in summer and 0.2 per day in winter, returning all biomass to

the PBR (complete cell-recycling). Clean effluent was removed faster than returning cells, causing a gradual PBR volume decrease. A water level sensor triggered fresh synthetic AnMBR effluent addition to maintain constant volume. However, continuous cell recycling leads to a gradual biomass concentration increase. Seven days of monitoring continued with the same strategy during daylight hours, repeated in triplicates after half the volume was replaced with fresh synthetic AnMBR effluent, and bioreactors reached stationary growth phase. 58 W fluorescence lamps provided uniform light during daylight hours at 200  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  in summer and 95  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  in winter. Daylight hours were 14 in summer and 10 in winter. Experiments were repeated in winter for measuring different weather performance.

After analyzing strategies one and two, real-life simulation occurred for 30 days each in summer and winter. The PBR was reset to initial concentrations reached at batch phase ends. Artificial light was restricted. All controls were automated, but nutrient levels and solar irradiance were measured hourly, with system changes made as needed.

Automated controls were set based on light intensities: Scenario i) During high light intensities, > 200  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ , cells were recycled back into the PBR, and clean effluent was removed with increasing dilution rates until nutrient concentrations reached German waste water discharge levels. Scenario ii) During average light intensities (100–200  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ), cell densities in the PBR were reduced to 0.800 g/L and maintained at a dilution rate of 0.3 per day. Scenario iii) During low light intensities (100  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ), cell densities in the PBR were reduced to 0.400 g/L and kept constant at a dilution rate of 0.2 per day.

Fig. 2 compares different strategies in different conditions. When

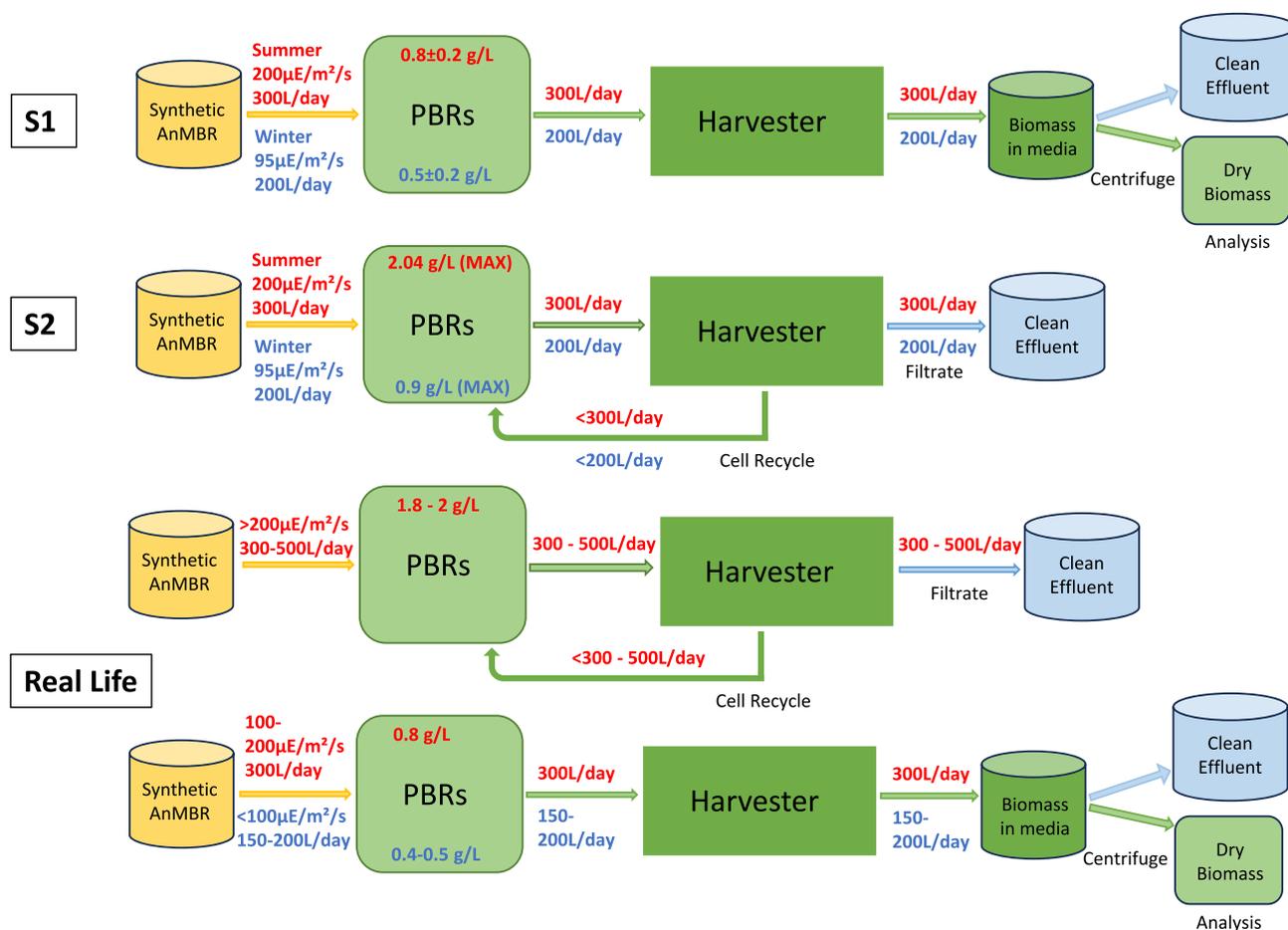


Fig. 2. Schematic representation of Stage 1 (S1- regular continuous cultivation), Stage 2 (S2-continuous cultivation with cell recycling) and real life scenarios tested during continuous cultivation. Red and blue colored text indicate light conditions and biomass concentrations in the PBR that trigger respective flow rates and direction of the harvested algae and the clean waste-water during each stage of operation. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

sensors detected high N or P levels, filtrate removal stopped, and water was recycled back into the PBR for complete nutrient removal. The turbidity sensor reported cell concentration reductions below a pre-set threshold, stopping biomass removal from the PBR and initiating cell recycling back into the PBR from the Harvester, while removing clean effluent for fresh AnMBR effluent addition. Proper photobioreactor positioning or elevation increases are common measures for maximum sunlight (Habibah et al., 2022; Kratky et al., 2023).

## 2.6. Biomass up concentration and harvesting

All the biomass that was removed from the PBR was transferred to another ultrafiltration unit, where all the excess water was removed from the biomass by gravity and hydrostatic pressure to further pre-concentrate the cells before centrifugation to reduce energy demand. Final concentration after this stage reached 5 g/L of biomass, however it is theoretically possible to up-concentrate further (Ortiz Tena et al., 2021). The biomass was removed from this separating unit every fortnight to prevent fouling of the biomass. Longer exposures to gravity and addition of more biomass-mixed-culture can be used to increase the biomass concentration even further. Finally, the biomass was dewatered using an industrial centrifuge (Delaval, Germany) and the biomass was frozen for later analysis. This step will be critical in any industrial application of this technology as well as help to reduce the total energy consumption of the process.

## 2.7. Dry biomass, optical density and nutrient densities

During each growth cycle, microalgal growth (measured via dry weight and optical density) and media composition (TN and TP) were monitored daily. At noon, 120 mL samples were collected from three positions in the photobioreactor. Dry biomass was gravimetrically measured. Triplicate 3 mL samples were filtered through pre-weighed GF/F filters, washed twice with DI water, and dried at 60 °C overnight. Filters with algae were oven-dried and finely weighed. Nutrient measurement included using 0.2 µm cellulose acetate syringe filters for algae-free supernatant, which was diluted and treated per NH<sub>4</sub> + -N and TP kits (LCK 305 and LCK 349, Hach, Germany). NH<sub>4</sub> + -N and TP concentrations were recorded using a spectrophotometer (Hach, DR 2800, Germany). Optical density at 750 nm was monitored by a spectrophotometer (6320D, Jenway, UK). The TN and TP uptake were calculated using Eq. (1), where  $c_i$  is the initial and  $c_f$  is the final, N or P concentrations (mg/L) respectively during a growth cycle of  $\Delta t_c$  (time taken to reach  $c_f$  from  $c_i$ ). WW purification rate ( $P_w$ ) was calculated using Eq. (2), where  $V_w$  is the total volume of WW treated during the growth cycle of  $\Delta t_c$ . The volumetric productivity ( $P_b$ ), was calculated using Eq. (3), where  $W_b$  is the dry biomass produced (grams) during a growth cycle of  $\Delta t_c$  from a total bioreactor capacity of  $V$  (liters).

$$P_x = \frac{c_f - c_i}{\Delta t_c} \quad (1)$$

$$P_w = \frac{V_w}{\Delta t_c} \quad (2)$$

$$P_b = \frac{W_b}{\Delta t_c V} \quad (3)$$

## 2.8. Major, minor and trace element compositions

Algae samples from the end of each stage were analyzed to valorize the amount of nutrients recovered. Major elements, including DOC, DIC and TN, were analyzed using a TOC analyzer (Multi N/C; Analytik-Jena, Germany) with 5 mg of dry lyophilized biomass. For minor element analysis like TP, the lyophilized samples were dried at 60 °C for at least 12 h before an aliquot of 200 mg was weighed into acid-cleaned PTFE open beakers and digested with 25 mL concentrated HNO<sub>3</sub> at 70–90 °C

for two hours on a hot plate. The solutions were evaporated and refilled with concentrated HCl twice and then filled up with 25 mL 0.5 M HNO<sub>3</sub>. All reagents were of suprapure grade (Merck, Germany) and DI water (18.2 MΩm) was used for dilution of the concentrated acids. All sample solutions were filtered through 0.2 µm membrane cellulose acetate filters with acid-cleaned syringes. The sample solutions were further diluted with 0.5 M HNO<sub>3</sub> and measured with a Spectro Ciros Vision ICP-OES. For quality control, the certified reference standard BCR-670 was simultaneously analyzed along with the algae samples. For details on the digestion method, quality control, use of internal standardization and instrument settings the reader is referred to (Zocher et al., 2021). The theoretical nutrient ( $e_{E,X}$ ) content of the biomass was calculated according to Eq. (4), using the starting ( $C_{Start}$ ) and end concentrations ( $C_{End}$ ) of the nutrient (E) and biomass (X) in g/L between a considered time interval.

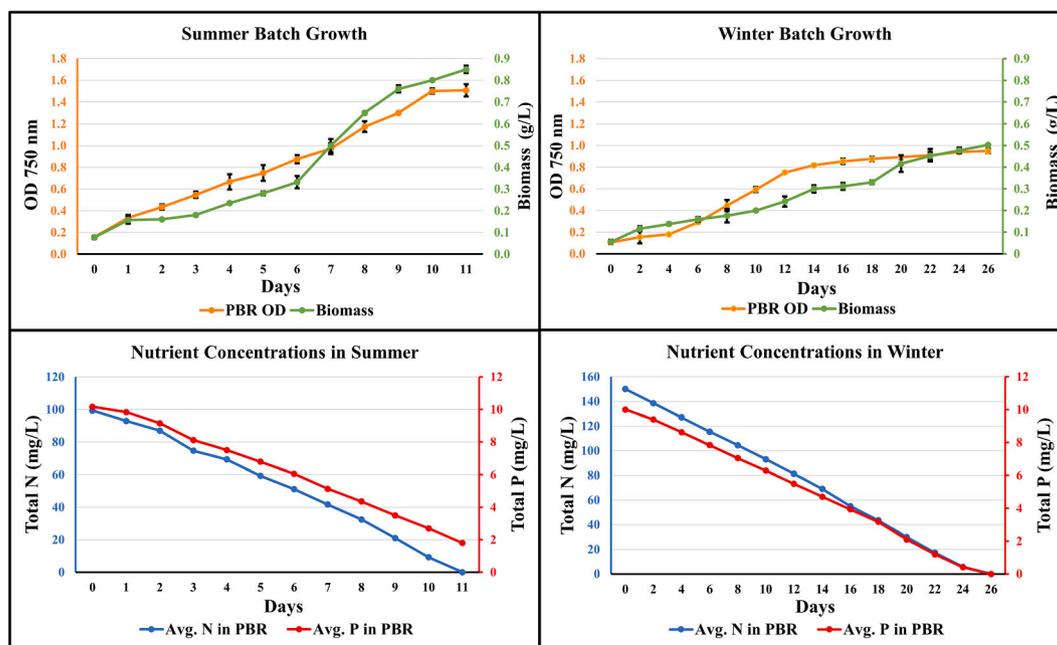
$$e_{E,X} = \frac{C_{E,start} - C_{E,end}}{C_{X,end} - C_{X,start}} \quad (4)$$

## 3. Results and discussion

### 3.1. Batch phase growth

The results of the batch phase growth used for mass balance and other calculations described below, are shown in Fig. 3. The system had a noticeable difference in performance in the two seasons evaluated (summer and winter). The starting biomass concentration in the bioreactors was  $0.077 \pm 0.020$  g/L in summer and  $0.055 \pm 0.020$  g/L in winter. Due to the large volume of media being circulated through the system, the cell concentration in the bag photobioreactors is not always homogeneous in low concentrations. This leads to slightly varied starting cell concentration each time. A phenomenon which is common in large scale industrial settings (Tan et al., 2020). However, in this case the difference in starting cell concentrations is so low ( $0.022 \pm 0.020$  g/L) that it was ignored for simplicity of future calculations. In summer, the final biomass concentration achieved was 0.850 g/L and all the nutrients supplied in the media was consumed within 11 days. However, in winter only one third of the summer biomass concentration was achieved (0.241 g/L) by day 12. The current growth rate is constrained by limited light availability, despite ample available nutrients in the media. Due to this light limitation, nutrient depletion is only achieved by day 26, yielding a maximum biomass concentration of 0.500 g/L. During summer, peak N and P removal rates were 12.33 mg/L/day and 1.04 mg/L/day respectively, whereas winter saw reduced rates of 7.00 mg/L/day for N and 0.54 mg/L/day for P. Average biomass productivity reached 0.070 g/L/day in summer and 0.017 g/L/day in winter (Table 1). In winter, N removal rates fell by 43.22 %, P removal rates by 48.56 %, and biomass productivity dropped by 75.32 % compared to summer. This decrease can be attributed to limited daylight hours and reduced total irradiance. The longer hydraulic retention time during the winter also means there was a loss of ammonia by evaporation, a phenomenon previously reported in other similar works that use aeration for agitation (Wang et al., 2022). The maximum biomass concentration was 0.500 g/L in winter versus 0.850 g/L in summer, despite higher starting nitrogen levels in synthetic AnMBR effluent during winter (Fig. 3). This is one of the critical challenges of maintaining photobioreactors in areas with less sunny days during winters that needs to be overcome (Satya et al., 2023). The native species have an advantage here by having survived and evolved in conditions that other species would just perish in.

Fig. 3 shows the nutrient concentrations in the PBR during each day of summer and winter cultivation. Initially N:P ratio was kept at 10:1 (w:w) because all previous lab scale results with this media and species showed consistent growth and complete nutrient removal. However, in the large-scale batch phase growth, it was observed that the N in the wastewater had completely been removed at day 11 with 1.8 mg/L of P



**Fig. 3.** The changes in the optical density, biomass, TP and TN concentrations in the PBR during batch phase growth in Summer (April) and Winter (December). Error bars indicate standard deviation.

remaining unconsumed through the next three days. The N:P ratio was therefore changed to 15 molN: 1 molP, for all further tests and complete N and P removal was observed in winter at day 26. The extra N seems to be necessary to ensure complete removal of P from the synthetic AnMBR effluent as P uptake is directly connected to N uptake (Wang et al., 2022). For the complete metabolism of the stored P reserves in the biomass from previous iterations of upscaling, a ratio closer to 15 molN:1 molP seems to be more efficient. This phenomenon has also been reported several times and summarised in the works of Geider and La Roche, 2002. To conclude, it can be seen that lower solar irradiance levels in winter lead to lower biomass productivities and WW treatment efficiency in PBRs during batch cultivation and a N:P ratio of 15:1 (150:10 mg/L) in the WW allows for complete nutrient removal in ideal conditions.

### 3.2. Continuous cultivation

#### 3.2.1. Stage 1 (S1)

Fig. 4 displays OD and biomass concentrations at day start and end for summer and winter Stage 1 operations. The autonomous handler aimed to sustain constant PBR biomass, using a minimum 0.3/day dilution rate. At < 0.3/day growth, a threshold prompted Harvester halt (wash-out) for cell regrowth; if densities kept falling, Harvester-to-PBR cell recycling began. Conversely if the nutrients in the PBR were measured to be above the allowed WW discharge levels of 10–15 mgN/L and 1–2 mgP/L, or a minimum reduction percentage of 70–80 % for N and 80 % for P, (Bundesumweltministeriums, 2023, Council Directive 91/271/EEC concerning urban waste-water treatment and Commission Directive 98/15/EC) is not achieved in the effluent, the filtration would be stopped to allow the cells to consume the extra nutrients. Fig. 4 indicates that this leads to variations in the daily PBR concentration ranges slightly ( $\pm 0.037$  g/L). Overnight rest let biomass catch up (Fig. 4).

Average maintained cell concentrations were 0.800 g/L (summer) and 0.485 g/L (winter). Average N removal: 45 mg/L/day (summer), 30 mg/L/day (winter); average P removal: 3 mg/L/day (summer), 2 mg/L/day (winter). Summer's average WW purification rate: 300 L/day; winter: 200 L/day; average biomass productivity: 0.24 g/L/day (summer), 0.12 g/L/day (winter). Compared with other stages (Table 1), winter operations saw 40 %, 33 %, 50 % lower average cell densities,

WW purification, and max biomass productivity, with average N and P removals down by 33 %. Despite 50 % lower biomass productivity, winter's WW purification dropped only 33 %. Lowering PBR cell concentrations ( $\approx$ half summer's) in low light improved nutrient uptake, but fluctuating natural light posed productivity challenges. It can be noted here that the PBR showed best performance at 0.485 g/L cell concentration in the winter conditions (<100  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ) at an average dilution rate of 0.2 per day. Maintaining PBRs at lower concentrations during low light improved nutrient uptake, leveraging more light per cell. Fluctuating light in continuous systems is a drawback. To address this in long-term natural light operations, an alternative strategy was explored.

#### 3.2.2. Stage 2 (S2)

Fig. 4 shows the OD and biomass as recorded at the beginning and end of each day during summer and winter stage 2 operations. Initially, biomass in PBR increased at batch phase growth rates, later slowing due to light inhibition, reaching max cell densities of 2.04 g/L (summer) and 0.80 g/L (winter). Max biomass productivity in summer was 0.37 g/L/day, winter was 0.21 g/L/day—54 % and 75 % higher than normal continuous cultivation (stage 1), reported in smaller lab setups (Bilad et al., 2014; Marbelia et al., 2014). N and P removal rates were similar to Stage 1, with WW treatment and AnMBR effluent additions remaining unchanged. In winter and summer, higher cell concentrations during intense light led to augmented biomass productivity with unchanged nutrient load (Table 1). Best winter results occurred at 0.80 g/L biomass with given available sunlight in winter.

Summer effluent nutrient levels were always below detection, but productivity declined near 2.5 g/L biomass. System likely starved due to cells using nutrients for maintenance. Dilution rate (0.3/day) could be increased to boost nutrient load, as also reported by others (Danaee et al., 2021; Masojídek et al., 2022). Winter saw effluent nutrients below detection for 3 days, crossing German discharge limits afterward. PBR halted effluent removal, enabling cell recycling for nutrient consumption before resuming treatment (Fig. 4). Over time during the winter trials, the cell concentration in the PBR was constant and even with minimum fluxes allowed by the pumps, the nutrient levels in the reactor increased above discharge levels and led to a reduction in the purification efficiency. This further suggested that the cells were not receiving enough sunlight to continue operating in the given conditions and hence

**Table 1**  
PBR performance during each stage of operations in summer and winter. Sum stands for summer and Win stands for winter. A positive % change indicates an improvement while a negative % change indicates reduction in performance.

	Batch			S1			S2			Real Life			% change S1 and S2			% change S1 and Real Life			% change S2 and Real Life			
	Sum	Win	% change	Sum	Win	% change	Sum	Win	% change	Sum	Win	% change	Sum	Win	% change	Sum	Win	% change	Sum	Win	% change	
	Average N Removal Rate (mg/L/day)	12.33	7	-43.22	45	30	-33.33	45	30	-33.33	43.5	37	-14.94	0	0	-3.33	+23.33	+23.33	-3.33	-3.33	+23.33	-3.33
Average P Removal Rate (mg/L/day)	1.04	0.595	-48.56	3	2	-33.33	3	2	-33.33	2.9	2.47	-14.83	0	0	-3.33	+23.5	+23.5	-3.33	-3.33	+23.5	-3.33	+23.5
Biomass Productivity (g/L/day)	0.07	0.017	-75.71	0.24	0.12	-50	0.37	0.21	-43.24	0.433	0.132	-69.52	0.433	0.132	+54.17	+80	+10	+17.03	+80	+10	+17.03	+10
WW Purification Rate (L/day)	91	38.5	-57.69	300	200	-33.33	300	200	-33.33	290	247	-14.83	290	247	-14.83	0	0	-3.33	-3.33	+23.5	-3.33	+23.5

operating with lower concentrations of cells would be better to maintain productivity in lower light exposures.

Hence only up-concentrating the PBR during continuous cultivation leads to light limitation in winter and nutrient limitation in summer when the dilution rate is kept constant. During summer, cell recycling (up-concentrating in the PBR) seems to be a good idea to realize higher dilution rates which lead to higher WW treatment volumes. For winter, MPBR system seems to drop in nutrient uptake efficiency, as amount of light per cell is key factor for performance.

### 3.2.3. Real life simulation

While conducting real life simulation of the continuous cultivation system, during high light intensities ( $>200 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ), cells were recycled back into the PBR and clean effluent was continuously removed with gradually increasing dilution rates until restricted by the filtrate nutrient discharge levels allowed in Germany (Council Directive 91/271/EEC concerning urban waste-water treatment and Commission Directive 98/15/EC). It has already been seen during the summer stage experiments, that the available sunlight is high enough to purify larger volumes of water than during low light intensities. This step allows over production of cells during high light intensity days allowing them to be used on the days with lower light intensities. During average light intensities distributed throughout the day ( $100\text{--}200 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ), the cell densities were reduced to  $0.80 \text{ g/L}$  by harvesting and maintained like strategy i) at a dilution rate of  $0.3$  per day as the stage 2 winter productions showed that the reactor has highest growth rates at cell concentrations of  $0.80 \text{ g/L}$  in these light intensities. During low light intensities ( $100 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ), the cell densities were further reduced to  $0.40 \text{ g/L}$  and kept constant with a dilution rate of  $0.2$  per day. It can be noted that minimum concentrations for best nutrient uptake performance in these light intensities was at  $0.40 \text{ g/L}$  reactor concentration.

During the summer (real life) continuous cultivation, the light intensities were mostly  $> 200 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  so scenario i) was most prevalent. However, reducing the PBR concentrations on cloudy days helped prevent a drop in the remediation efficiency. Total amount of wastewater purified during the 30 days of operation was  $8700 \text{ L}$  and  $13 \text{ kg}$  dry biomass was generated. The average biomass productivity rate of  $0.433 \text{ g/L/day}$  of total photobioreactor capacity was  $80 \%$  higher at the cost of  $10 \text{ L/day}$  ( $3.33 \%$ ) reduction in total amount of WW purified per day compared to normal continuous cultivation operations in summer (Stage 1) (Table 1). In the winter, scenarios ii) and iii) were more prevalent hence the PBR had to be maintained at lower concentrations, but the MPBR allowed the cells to be stored for a short time of  $12 \text{ h}$  and reused during higher sunlight availability. Total amount of wastewater purified during the winter 30 days of operation was  $7400 \text{ L}$  and  $3.964 \text{ kg}$  dry biomass was generated with a biomass productivity rate of  $0.132 \text{ g/L/day}$  of total photobioreactor capacity. The winter trials seem to have  $10 \%$  more biomass productivity with about  $23 \%$  increase in N and P removal rates compared to normal continuous cultivations (Stage 1) in the same conditions (Table 1) as cells were recycled on days with higher sunlight to boost remediation efficiency. WW purification rate was also boosted by  $23.5 \%$  during these trials. It is important to note that it was possible to maintain the productivities and purification rates while continuously treating WW for 30 days with nutrient levels in the PBR and clean effluent being lower than detection limits.

Comparing with the productivities achieved during all other previous trials (Table 1) the biomass productivity during the summer operations over a month was most efficient even when compared with other work done on the same species in lab-scale which report between  $0.12$  and  $0.19 \text{ g/L/day}$  (Wang et al., 2022). However, winter biomass productivity was lower by almost  $70 \%$  from summertime operations. Although biomass productivities were lower, wastewater purification rate is still at  $25 \%$  of photobioreactor capacity per day which is very close to the summer purification rates of  $29 \%$  of reactor capacity. This is at par with current bioreactor-based wastewater treatment technology purification rates. The system maintains sufficient purification

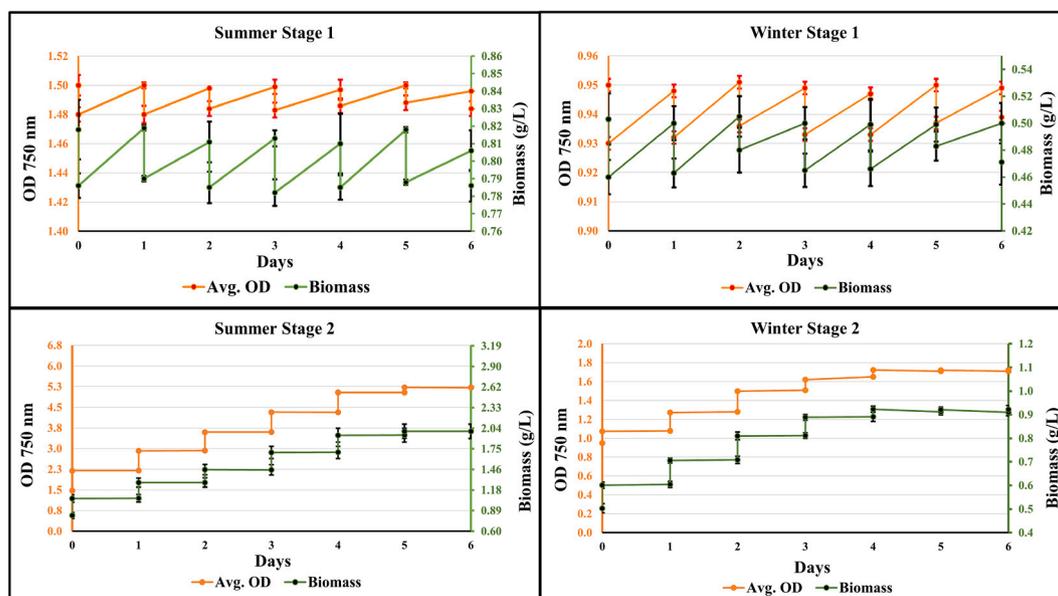


Fig. 4. The changes in the optical density and biomass in the PBR during continuous phase studies (Stage 1 and 2) in summer (May – July) and Winter (January – March). Error bars indicate standard deviation. Two points of data on the same day are from the start and end of the day's treatment process.

efficiency even during the winter at the cost of biomass. Cell recycling seems to be an effective strategy in enhancing algae-based wastewater treatment by increasing the biomass concentration in the PBR during high light intensities while maintaining lower cell concentrations during low light intensities thus increasing wastewater purification efficiency at the cost of biomass productivity.

### 3.3. Element analysis and mass balance

Table 2 shows the content of the elements N, P and C in the algae biomass as average of triplicate values taken from different positions of the reactor in each stage of the optimisation process during summer and winter. In all stages, summer biomass exhibited N content ranging from 10 % to 15 %, and winter biomass varied between 15 % and 25 % (Table 2). Summer's microalgal cell P content ranged from 0.67 % to 1.25 %, while winter saw values between 1.05 % and 2 %. These values align with species-specific compositions in other publications—2.9 %–11 % N and 0.5 %–1.7 % P—which mirror summer biomass composition (Wang et al., 2022). Colder temperatures and lower solar irradiance during winter contributed to higher N and P values. Although a heat exchanger was employed during the winter to keep the PBR temperature at 25 °C, it was only effective up to external temperature –5 °C (inside greenhouse temp.: 5 °C). With temperatures dropping below

–5 °C, the PBR temperature would drop below 25 °C but never lower than 19 °C. However, these lower temperatures and light conditions trigger lipid and protein accumulation in the cells that leads to higher N and P content in the biomass (Zhao, Han and Cao, 2020; López Muñoz and Bernard, 2021).

Average TN and TP in the PBR's clean effluent, across all continuous cultivation stages, were below detection limit, indicating microalgae's efficient N and P recovery. Focusing on summer data (Table 2), during stage one (S1), average N and P added and consumed by cells over 7 days were 315g and 21g respectively. At the end of S1, average biomass N and P content were 15 % and 1.25 % respectively. Over the 7 days, with 0.24 g/L/day average summer biomass growth, about 252 g TN and 21 g TP accumulated in biomass—roughly 80 % of TN and 100 % of TP that entered PBR. Additionally, microalgal biomass's TN and TP content at each stage's start was about 6 % and 0.4 % respectively, signifying 64 % of TN and 84 % of TP entering the PBR accumulating in biomass. There seems to be loss of nitrogen and phosphorus that was not assimilated in the biomass. This difference between the measured and theoretical N/P content was observed during all stages of the experiment (3–40 %) which can be attributed to loss by evaporation of ammonia, a phenomenon also reported in other similar works that use aeration for agitation and have openings in the PBR to allow for excess air to escape (Wang et al., 2022). Higher UV exposure or colder temperatures lead to

Table 2

Major elements (N, P and C) content in microalgal biomass at the end of each stage of operation and total N and P added to the PBR during this period were used to calculate total percentage of nutrients recovered. TN stands for total nitrogen; TP stands for total phosphorus and C is the carbon content in the biomass.

	N added (g)	TN (%)	(%) N Recovered	P added (g)	TP (%)	(%) P Recovered	C (%)
<b>Summer</b>							
Day 0		6.00 ± 0.50			0.40 ± 0.01		
Batch Phase	100	12.00 ± 0.17	97	10	1.25 ± 0.01	99	52.13
S 1	315	15.00 ± 0.13	64	21	1.25 ± 0.01	84	51.98
S 2	315	12.16 ± 0.14	84	21	0.81 ± 0.01	84	53.21
Real Life	1305	10.00 ± 0.19	96	87	0.67 ± 0.01	96	52.11
<b>Winter</b>							
Batch Phase	150	20.00 ± 0.11	65	10	2.00 ± 0.01	98	48.23
S 1	210	25.00 ± 0.16	86	14	1.50 ± 0.01	81	47.94
S 2	210	15.00 ± 0.16	91	14	1.05 ± 0.01	96	51.98
Real Life	1110	25.00 ± 0.18	87	75	1.80 ± 0.01	94	53.12

increased biofilm formation, rich in proteins, phospholipids, nucleic acids, and amino acids which are known reservoirs for N and P (Cheah & Chan, 2021). Biofilms left in the bioreactors after biomass harvest lead to underestimated N and P recovery. Preventive measures like hydrophobic coatings or shading during summer can curb biofilm losses. In contrast, there seem to be almost complete recovery of N (87–96 %) and P (94–96 %) from the added synthetic effluent in the real life stages of the experiment. This is at par with most recent wastewater treatment technologies in the market. The carbon content in algal biomass was very stable, above 50 % over the whole experiment. During the experiment, 0.2 g/L of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (22.6 mg/L of C) was added to the synthetic AnMBR effluent prepared to balance the pH, which is negligible enough to assume that most of the carbon in the biomass came from the atmosphere. Approximately, 1.8 kg CO<sub>2</sub> can be fixed by producing 1 kg of dry biomass from the atmosphere. Therefore, the average biomass yield of 0.433 g/L/d and 0.132 g/d during the summer and winter real life culture stages can lead to a CO<sub>2</sub> sequestration rate of 390 kg CO<sub>2</sub>/day – 119 kg CO<sub>2</sub>/day in a one-hectare plant (PBR capacity 500,000L).

This study demonstrated an all year microalgal wastewater treatment scheme for treating AnMBR treated secondary wastewater in different light conditions, using a PBR setup with an external separation unit to create a MPBR system. Although such systems have been rarely explored, the results show that it is a fairly simple but dynamic system that allows precise control over PBR concentrations of cells and nutrients allowing for unhindered WW remediation operations even during low light conditions (>90 µE/m<sup>2</sup>/s) using only natural sunlight. The dilution rates used during the process are not universal and will change from location to location and from setup to setup, but they can be easily calculated using these simple sets of repeatable sequences. The distance between the photobioreactors can be increased further to prevent shadowing from each other and increase overall productivity by increasing the amount of direct sunlight exposure to the bags. However, this would also result in lower volume concentration per area, thus, 1 m is considered as the best compromise. A drawback in the current system would be the lack of a solar irradiance sensor and N and P sensor which made it necessary to manually measure these values hourly and amend the system. However, with these sensors coupled to the autonomous onboard computer, the process can be fully automated for largescale industrial purposes. It can be safely concluded that nutrients (N, P and C) can be effectively removed and stored by microalgae from common food grade wastewaters but maintaining a balance between the cell concentrations and available sunlight is key to keeping the system efficient. Thus, the current system can be proposed for long term industrial wastewater treatment and biomass productivity based on the geographical location.

#### 4. Conclusion

Implementing cell recycling significantly improved biomass productivity, with an 80 % increase in summer and 10 % in winter compared to standard continuous cultivation. Winter N/P removal rates increased by 23 %, while summer rates remained constant. This highlights cell recycling's effectiveness in microalgae-based wastewater treatment. Nutrient recovery was nearly complete, capturing 87–96 % N and 94–96 % P in the biomass. The system consistently produced effluent suitable for European water bodies, averaging 30 % of photobioreactor capacity daily. These findings emphasize the potential of this technology for sustainable and efficient wastewater treatment.

#### 5. Data availability

E-supplementary data for this work can be found in e-version of this paper online and in the online data repository - Dey, Rohit (2023), "Exploring advanced phycoremediation strategies for nutrient recovery from secondary wastewater sources using a largescale membrane photobioreactor system-Datasets and supplementary material.", Mendeley

Data, V1, <https://data.mendeley.com/datasets/t6vfxmddpf/2>.

#### CRedit authorship contribution statement

**Rohit Dey:** Conceptualization, Investigation, Visualization, Writing – original draft. **Franziska Ortiz Tena:** Investigation, Validation, Writing – review & editing, Supervision. **Song Wang:** Investigation, Validation, Writing – review & editing, Supervision. **Josef Martin Messmann:** . **Christian Steinweg:** . **Claudia Thomsen:** Investigation, Writing – review & editing, Validation. **Clemens Posten:** Investigation, Writing – review & editing, Validation. **Stefan Leu:** Investigation, Writing – review & editing, Validation. **Matthias S. Ullrich:** Investigation, Writing – review & editing, Validation. **Laurenz Thomsen:** Conceptualization, Writing – review & editing, Validation.

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### References

- Abuabdou, S.M.A., Ahmad, W., Aun, N.C., Bashir, M.J.K., 2020. A review of anaerobic membrane bioreactors (AnMBR) for the treatment of highly contaminated landfill leachate and biogas production: Effectiveness, limitations and future perspectives. *J. Clean. Prod.* 255, 120215 <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120215>.
- Bilad, M.R., Discart, V., Vandamme, D., Foubert, I., Muylaert, K., Vankelecom, I.F.J., 2014. Coupled cultivation and pre-harvesting of microalgae in a membrane photobioreactor (MPBR). *Bioresour. Technol.* 155, 410–417. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.026>.
- Bundesumweltministeriums, n.d. Waste Water Ordinance - BMUV-Laws [WWW Document]. *bmu.de*. URL <https://www.bmu.de/en/law/waste-water-ordinance> (accessed 2.24.23).
- Cheah, Y.T., Chan, D.J.C., 2021. Physiology of microalgal biofilm: a review on prediction of adhesion on substrates. *Bioengineered* 12, 7577–7599. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1980671>.
- Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25, 294–306. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.02.001>.
- Danaee, S., Heydarian, S.M., Ofoghi, H., Badali, N., 2021. Optimization, upscaling and kinetic study of famine technique in a microalgal biofilm-based photobioreactor for nutrient removal. *Environ. Technol. Innov.* 24, 102043 <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.102043>.
- Geider, R., La Roche, J., 2002. Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. *Eur. J. Phycol.* 37, 1–17. <https://doi.org/10.1017/s0967026201003456>.
- Gonçalves, A.L., Pires, J.C.M., Simões, M., 2017. A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. *Algal Res.* 24, 403–415. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.11.008>.
- Goswami, R.K., Agrawal, K., Upadhyaya, H.M., Gupta, V.K., Verma, P., 2022. Microalgal conversion to alternative energy, operating environment and economic footprint: an influential approach towards energy conversion, and management. *Energ. Convers. Manage.* 269, 116118 <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2022.116118>.
- Grossman, A.D., Belete, Y.Z., Boussiba, S., Yogeve, U., Posten, C., Ortiz Tena, F., Thomsen, L., Wang, S., Gross, A., Leu, S., Bernstein, R., 2021. Advanced near-zero waste treatment of food processing wastewater with water, carbon, and nutrient recovery. *Sci. Total Environ.* 779, 146373 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146373>.
- Habibah, E., Suyono, E.A., Koerniawan, M.D., Suwanti, L.T., Siregar, U.J., Budiman, A., 2022. Potential of natural sunlight for microalgae cultivation in Yogyakarta. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 963, 012041 <https://doi.org/10.1088/1755-1315/963/1/012041>.
- Han, J., Thomsen, L., Pan, K., Wang, P., Wawilow, T., Osundeko, O., Wang, S., Theilen, U., Thomsen, C., 2019. Treating wastewater by indigenous microalgae strain in pilot platform located inside a municipal wastewater treatment plant. *Environ. Technol.* 1–11 <https://doi.org/10.1080/09593330.2019.1604816>.
- Honda, R., Boonnorat, J., Chiemchaisri, C., Chiemchaisri, W., Yamamoto, K., 2012. Carbon dioxide capture and nutrients removal utilizing treated sewage by concentrated microalgae cultivation in a membrane photobioreactor. *Bioresour. Technol.* 125, 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.138>.
- Hunter, R.G., Day, J.W., Wiegman, A.R., Lane, R.R., 2019. Municipal wastewater treatment costs with an emphasis on assimilation wetlands in the Louisiana coastal zone. *Ecol. Eng.* 137, 21–25. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2018.09.020>.
- Ji, F., Liu, Y., Hao, R., Li, G., Zhou, Y., Dong, R., 2014. Biomass production and nutrients removal by a new microalgae strain *Desmodesmus* sp. in anaerobic digestion wastewater. *Bioresour. Technol.* 161, 200–207. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.034>.
- Kim, B.-H., Choi, J.-E., Cho, K., Kang, Z., Ramanan, R., Moon, D.-G., Kim, H.-S., 2018. Influence of water depth on microalgal production, biomass harvest, and energy

- consumption in high rate algal pond using municipal wastewater. *J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 630–637. <https://doi.org/10.4014/jmb.1801.01014>.
- Kong, Z., Xue, Y., Hao, T., Zhang, Y., Wu, J., Chen, H., Song, L., Rong, C., Li, D., Pan, Y., Li, Y., Li, Y.-Y., 2022. Carbon-neutral treatment of N, N-dimethylformamide-containing industrial wastewater by anaerobic membrane bioreactor (AnMBR): bio-energy recovery and CO<sub>2</sub> emission reduction. *Bioresour. Technol.* 358, 127396 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127396>.
- Kratky, L., Jirout, T., Belohlav, V., 2023. Economic feasibility study for artificial lighting of microalgal flat-panel photobioreactors. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1007/s13762-023-04804-0>.
- Li, N., Wan, Y., Wang, X., 2020. Nutrient conversion and recovery from wastewater using electroactive bacteria. *Sci. Total Environ.* 706, 135690 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135690>.
- López Muñoz, I., Bernard, O., 2021. Modeling the influence of temperature, light intensity and oxygen concentration on microalgal growth rate. *Processes* 9, 496. <https://doi.org/10.3390/pr9030496>.
- Maaz, M., Yasin, M., Aslam, M., Kumar, G., Atabani, A.E., Idrees, M., Anjum, F., Jamil, F., Ahmad, R., Khan, A.L., Lesage, G., Heran, M., Kim, J., 2019. Anaerobic membrane bioreactors for wastewater treatment: Novel configurations, fouling control and energy considerations. *Bioresour. Technol.* 283, 358–372. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.061>.
- Mahmood, Z., Cheng, H., Tian, M., 2022. A critical review on advanced anaerobic membrane bioreactors (AnMBRs) for wastewater treatment: advanced membrane materials and energy demand. *Environ. Sci. Water Res. Technol.* 8, 2126–2144. <https://doi.org/10.1039/d2ew00300g>.
- Maltsev, Y., Maltseva, K., Kulikovskiy, M., Maltseva, S., 2021. Influence of light conditions on microalgae growth and content of lipids, carotenoids, and fatty acid composition. *Biology* 10, 1060. <https://doi.org/10.3390/biology10101060>.
- Marbelia, L., Bilad, M.R., Passaris, I., Discart, V., Vandamme, D., Beuckels, A., Muylaert, K., Vankelecom, I.F.J., 2014. Membrane photobioreactors for integrated microalgae cultivation and nutrient remediation of membrane bioreactors effluent. *Bioresour. Technol.* 163, 228–235. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.012>.
- Masojídek, J., Gómez-Serrano, C., Ranglová, K., Cicchi, B., Encinas Bogeat, Á., Câmara Manoel, J.A., Sanches Zurano, A., Silva Benavides, A.M., Barceló-Villalobos, M., Robles Carnero, V.A., Ördög, V., Gómez Pinchetti, J.L., Vörös, L., Arbib, Z., Rogalla, F., Torzillo, G., Lopez Figueroa, F., Ación-Fernández, F.G., 2022. Photosynthesis monitoring in microalgae cultures grown on municipal wastewater as a nutrient source in large-scale outdoor bioreactors. *Biology* 11, 1380. <https://doi.org/10.3390/biology11101380>.
- Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, Nidia., S., 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14, 217–232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>.
- Nagarajan, D., Lee, D.-J., Chen, C.-Y., Chang, J.-S., 2020. Resource recovery from wastewaters using microalgae-based approaches: a circular bioeconomy perspective. *Bioresour. Technol.* 302, 122817 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122817>.
- Ortiz Tena, F., Steinweg, C., Posten, C., 2020. Membrane-harvesting for optimized wastewater treatment using microalgae. *Chem. Ing. Tech.* 92, 1371. <https://doi.org/10.1002/cite.202055487>.
- Ortiz Tena, F., Ranglová, K., Kubač, D., Steinweg, C., Thomson, C., Masojídek, J., Posten, C., 2021. Characterization of an aerated submerged hollow fiber ultrafiltration device for efficient microalgae harvesting. *Eng. Life Sci.* 21, 607–622. <https://doi.org/10.1002/elsc.202100052>.
- Robles, Á., Durán, F., Giménez, J.B., Jiménez, E., Ribes, J., Serralta, J., Seco, A., Ferrer, J., Rogalla, F., 2020. Anaerobic membrane bioreactors (AnMBR) treating urban wastewater in mild climates. *Bioresour. Technol.* 314, 123763 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123763>.
- Satya, A.D.M., Cheah, W.Y., Yazdi, S.K., Cheng, Y.-S., Khoo, K.S., Vo, D.-V.-N., Bui, X.D., Vithanage, M., Show, P.L., 2023. Progress on microalgae cultivation in wastewater for bioremediation and circular bioeconomy. *Environ. Res.* 218, 114948 <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114948>.
- Tan, J.S., Lee, S.Y., Chew, K.W., Lam, M.K., Lim, J.W., Ho, S.-H., Show, P.L., 2020. A review on microalgae cultivation and harvesting, and their biomass extraction processing using ionic liquids. *Bioengineered* 11, 116–129. <https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1711626>.
- Wang, S., Said, I.H., Thorstenson, C., Thomsen, C., Ullrich, M.S., Kuhnert, N., Thomsen, L., 2018. Pilot-scale production of antibacterial substances by the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. *Algal Res.* 32, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.03.014>.
- Wang, S., Ortiz Tena, F., Dey, R., Thomsen, C., Steinweg, C., Kraemer, D., Grossman, A. D., Belete, Y.Z., Bernstein, R., Gross, A., Leu, S., Boussiba, S., Thomsen, L., Posten, C., 2022. Submerged hollow-fiber-ultrafiltration for harvesting microalgae used for bioremediation of a secondary wastewater. *Sep. Purif. Technol.* 289, 120744 <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2022.120744>.
- Zhao, T., Han, X., Cao, H., 2020. Effect of temperature on biological macros of three microalgae and application of ft-ir for evaluating microalgal lipid characterization. *ACS Omega* 5, 33262–33268. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c04961>.
- Zocher, A.-L., Klimpel, F., Kraemer, D., Bau, M., 2021. Assessing the bioavailability of dissolved rare earths and other trace elements: digestion experiments with aquatic plant species *Lemna minor* (“duckweed” reference standard BCR-670). *Appl. Geochem.* 134, 105025 <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2021.105025>.

## 7.5 Continuous microalgae cultivation for wastewater treatment - development of a process strategy during day and night

**DOI:**

**Journal:** Science of the Total Environment

**Autoren:** Franziska Ortiz Tena, Victoria Bickel, Christian Steinweg, Clemens Posten

### Zusammenfassung

Im Zuge der konventionellen Abwasseraufbereitung ist die direkte Rückgewinnung von Nährstoffen aus dem Abwasser nicht möglich. Mikroalgen fixieren die wertvollen Nährstoffe Stickstoff und Phosphor sehr effizient in ihre Biomasse, wodurch sie für eine Anwendung in der Abwasserreinigung prädestiniert sind. Allerdings werden mikroalgen-basierte Prozesse durch natürliches Sonnenlicht als Energiequelle angetrieben, was einen kontinuierlichen Prozessbetrieb bei Tag sowie in der Nacht erschwert. Ziel der vorliegenden Studie war es daher, die Stoffwechselaktivitäten der kontinuierlich kultivierten Mikroalge *Chlorella vulgaris* bei Licht- und Dunkelperioden (16 h:8 h) zu untersuchen, wobei der Schwerpunkt auf der Nährstoffaufnahme aus einem synthetischen Abwasser während der Nacht lag. Die Variation der Verdünnungsrate  $D$  ( $D = 0,0-1,0 \text{ d}^{-1}$  in  $0,1 \text{ d}^{-1}$ -Schritten) induziert unterschiedliche Limitierungszustände für das Mikroalgenwachstum. Nährstofflimitierungen bei niedrigen Verdünnungsraten führen zu einer Akkumulation intrazellulärer Speicherkomponenten (Kohlenhydraten und Lipiden) von  $\sim 70 \%_{\text{BTM}}$ , Stärke wird zudem bei Abwesenheit von Licht in Lipide umgewandelt. Bei mittleren bis hohen  $D$ -Werten wird die Wachstumsrate durch Lichtlimitierung determiniert, wodurch die intrazellulären Speicherkomponenten auf  $\sim 20 \%_{\text{BTM}}$  reduziert werden. Die vollständige Nährstoffaufnahme ist bis  $D = 0,5 \text{ d}^{-1}$  messbar, wodurch der obere Schwellenwert des Betriebspunkts für die Abwasserreinigung festgelegt wird. An diesem Punkt sind die Zellen durch hohe Protein- (bis zu  $57 \%_{\text{BTM}}$ ) und Pigmentgehalte (bis zu  $6,9 \%_{\text{BTM}}$ ) charakterisiert. Während der Nacht ist außerdem der Aufbau von Proteinen auf Kosten intrazellulärer Speicherkomponenten sichtbar. Unter Anwendung des Konzepts der aktiven Biomasse (Zellen ohne Speicherkomponenten) wurde ein konstanter Protein- ( $\sim 68 \%_{\text{ABM}}$ ) und Stickstoffgehalt ( $11,94 \%_{\text{ABM}}$ ) der Mikroalgenzellen ermittelt. Ein Stickstoff-Spiking-Experiment wies die Aufnahme von Stickstoff sowie die Teilung der Mikroalgenzellen während der Nachtperiode eindeutig nach. Auf der Grundlage der experimentellen Daten wurde ein Betriebsfenster für einen kontinuierlichen Abwasseraufbereitungsprozess entworfen. Dadurch kann eine kontinuierliche mikroalgen-basierte Abwasserreinigung während Tag und Nacht ohne den Einsatz künstlicher Beleuchtung postuliert werden. Die Berechnungen ergaben die Machbarkeit der Aufbereitung eines Abwassers im Laufe von 24 h durch die Rückführung von Zellen sowie der Speicherung von kohlehydratreicher Biomasse. Am Ende der Nacht steht die proteinreiche Biomasse für die weitere Verwertung zur Verfügung.



## Continuous microalgae cultivation for wastewater treatment – Development of a process strategy during day and night

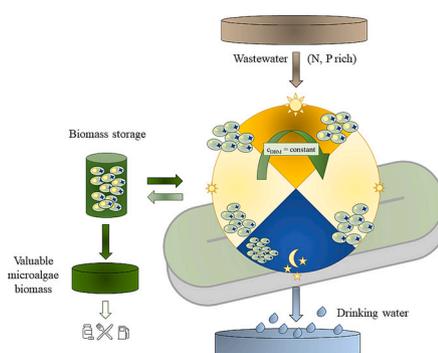
Franziska Ortiz Tena<sup>\*</sup>, Victoria Bickel, Christian Steinweg, Clemens Posten

Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Institute of Process Engineering in Life Sciences, Bioprocess Engineering, Fritz-Haber-Weg 2, 76131 Karlsruhe, Germany

### HIGHLIGHTS

- Feasibility of 24 h continuous microalgae-based wastewater treatment proven
- Process control enables accumulation of intracellular carbon storage during day.
- Nocturnal nitrogen uptake at cost of intracellular carbon storage
- Concept of active biomass applied to microalgae

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

Editor: Paola Verlicchi

#### Keywords:

*Chlorella vulgaris*  
Active biomass concept  
Macromolecular composition  
Night respiration  
Continuous wastewater treatment

### ABSTRACT

Conventional wastewater treatment (WWT) is not able to recycle nutrients from the wastewater (WW) directly. Microalgae integrate the valuable nutrients nitrogen and phosphorus within their biomass very efficiently, making them predestined for an application in WWT. Nevertheless, microalgae-based processes are driven by natural sunlight as energy source, making a continuous process mode during day and night difficult. The aim of this study was therefore to investigate metabolic activities of the continuously cultivated microalgae *Chlorella vulgaris* at light and dark periods (16 h, 8 h) with focus on nutrient uptake during night from a synthetic WW. Varying the dilution rate  $D$  ( $D = 0.0\text{--}1.0\text{ d}^{-1}$  in  $0.1\text{ d}^{-1}$ -steps) causes different limitations for algae growth. Nutrient limitations at low  $D$ 's cause maximum accumulation of intracellular storage components (sum of carbohydrates and lipids) of  $\sim 70\%$  of dry biomass, starch is converted to lipids at the absence of light. From middle to high  $D$ 's, the growth rate is determined by light limitation, reducing the intracellular storage components to  $\sim 20\%$  of dry biomass. Complete nutrient uptake is measurable up to  $D = 0.5\text{ d}^{-1}$ , marking the maximum operating point for wastewater purification. At that point, cells are characterised by high protein (up to  $57\%_{\text{DBM}}$ ) and pigment (up to  $6.9\%_{\text{DBM}}$ ) quotas. During the night, the build-up of proteins at the degradation of intracellular storage components is furthermore visible. Applying the concept of active biomass (cells without storage components), a constant cellular protein ( $\sim 68\%_{\text{ABM}}$ ) and nitrogen quota ( $11.94\%_{\text{ABM}}$ ) was revealed. A nitrogen spiking experiment clearly showed nitrogen uptake and proliferation during the night period. Based on the experimental data, a window of operation for a continuous WWT process was designed, allowing the hypothesis that continuous WWT using microalgae during day and night operation is possible without the supplementation

<sup>\*</sup> Corresponding author.

E-mail address: [franziska.ortiz-tena@kit.edu](mailto:franziska.ortiz-tena@kit.edu) (F. Ortiz Tena).

of artificial light. This revealed the system's capacity to treat WW throughout 24 h applying cell recycling and storage of carbohydrate-rich biomass. At the end of the night, protein-rich biomass is available for further valorisation.

## 1. Introduction

Efficient WWT is one of the most important challenges of the 21st century, as water has been pronounced a human right in 2010 by the United Nations (German Environment Agency (UBA), 2018). Wastewaters mainly contain various levels of carbon (C), nitrogen (N), and phosphorus (P) that need to be removed before being discharged into natural water bodies. Conventional modern WWT plants are capable of eliminating those efficiently – but in case of N and P, nutrients are released into the environment and atmosphere ( $N_2$ ) or precipitated (P), being lost for direct further use. Recovery of those nutrients, e.g. for application as fertilisers or as a food supplement, is highly energy-consuming and thus unsustainable. Already since the 1950s, the potential of microalgae for WWT has been studied (Oswald et al., 1957). Especially the incorporation of N and P into the cellular functional macromolecules is advantageous compared to conventional methods, generating a nutrient-rich biomass (Bux and Chisti, 2016; Li et al., 2019; Monfet and Unc, 2017). The macromolecular composition of microalgae cells basically includes energy-rich storage compounds, such as starch (short-term storage) and lipids (long-term storage) as well as proteins, pigments, and nucleic acids (DNA and RNA). The nutrients fixed within the algal biomass are thereby directly available for various applications. Nutrient uptake by the algae cell is highly effective and results in very low residual concentrations ( $C_N < 1 \text{ mg}_N \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $C_P$ : below the limit of detection) (Beuckels et al., 2015; Xin et al., 2010). As microalgae use natural sunlight as energy source, no chemicals, external energy source, or organic feedstock is needed for remediation. Being an advantage on the one hand, this is one of the mayor challenges of microalgae based WWT processes as natural light is only available during day. WWs usually need to be treated continuously, which is so far not feasible without the adaption of the process operation, e.g., by light supplementation during dark periods (at the expense of process sustainability) or reducing or stopping the continuous cultivation mode at the absence of light. Insufficient remediation due to variable natural light conditions (due to seasons, weather, daytime) and the fluctuating WW composition are further challenges of microalgae-based WWT. The latter addresses the nutrient uptake capacity of microalgae: It is well known that algae cells favour a specific ratio of N:P of 16:1 (Redfield ratio) in the culture medium for total nutrient uptake and optimal growth (Berman-Frank and Dubinsky, 1999; Jover et al., 2014), reflecting the macromolecular composition, mainly proteins (~50 % (w/w)) and nucleic acids (~10 % (w/w)), and their stoichiometry under favourable culture conditions. As microalgae can accumulate intracellular phosphate (Powell et al., 2009; Sforza et al., 2018; Solovchenko et al., 2019), it is possible to overcome the strict N:P ratio within certain limits. Next to the nutrient ratio, the rather low nutrient concentrations in most WWs are another challenge. There are some exceptions – mainly piggery and dairy WW – but N and P concentrations within most sewages usually vary between 4.0 and 40.0  $\text{mg}_N \cdot \text{L}^{-1}$  as well as 0.15 and 9.2  $\text{mg}_P \cdot \text{L}^{-1}$  (Li et al., 2019; Luo et al., 2017; Zhang et al., 2019). Assuming a theoretical, intracellular N content of 10 %, only low biomass concentrations of ~40–400  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  are achievable using those WWs as a culture medium. With respect to a further valorisation of the algae biomass, higher cell concentrations are aimed to facilitate the downstream process and to improve the overall productivity (Ortiz Tena et al., 2021).

A possible approach to overcoming the aforementioned drawbacks of microalgae-based WW remediation is the application of cell recycling or retention techniques (Luo et al., 2017). In the context of WWT, membrane technology, more precisely polyvinylidene fluoride (PVDF) hollow fibers, is usually predominant (Zhang et al., 2019). The combination

of membranes (internal or external) at the microalgae culture stage (photobioreactor) results in a so-called membrane-photobioreactor (MPBR), enabling the enhancement of the biomass concentration in the PBR, thus lowering HRTs and increasing productivities as well as nutrient uptake (Luo et al., 2017; Marbelia et al., 2014). Especially on days with low light availability, the resulting slow growth can thus be balanced. External filtration devices even allow to adjust cell concentrations to desired levels and to react to fluctuating environmental changes more specifically compared to internal membranes (Luo et al., 2017; Ortiz Tena et al., 2021). Therefore, the adjustment of the biomass concentration in the PBR can be considered a degree of freedom to influence a microalgae-based WWT process. Furthermore, MPBRs allow the adaption of the microalgal physiology: Adjusting the biomass concentration inside the PBR affects the availability of nutrients and light per cell. The quotas of the intracellular microalgal macromolecules are not constant but reflect the environmental conditions the algae are facing (Dickinson et al., 2013; Safi et al., 2014; Samori et al., 2014; Su, 2021). If more light energy is provided to the cells than can be used for growth determined by N-availability, the build-up of intracellular energy-rich storage components (mainly starch and lipids) is induced (Dillschneider et al., 2013; Zhu et al., 2014), which is capitalised for example for algal biofuel production (Christenson and Sims, 2011). During periods with low or no light, those components are used to maintain the microalgae metabolism and – more importantly – to enable further nutrient uptake or even proliferation (León-Saiki et al., 2017). Knowing the correlations of culture conditions and macromolecular composition, e.g. starch build-up, this can be used to direct the cellular composition during the day to optimise nutrient uptake according to the light availability and WW composition (mainly nutrient load). In particular, nutrient uptake can be triggered during night, assuming a sufficient starch pool was generated during hours when light was available. Thus, the macromolecular composition can be regarded as a second degree of freedom for optimal operation of microalgae-based WWT processes.

Only few studies have been done applying continuous cultivation of microalgae in the field of WWT. Most investigation is done batch-wise or semi-continuously, focusing on the algae metabolism under light availability. Often, continuous cultivation is stopped during night to prevent a wash-out without sampling. This leads to a lack of information for the dark period although it is well known that metabolic activities also take place when light is absent. As WWT needs to take place continuously for 24 h, those studies do not address real-life scenarios for the development of WWT strategies for day- and nighttime. In the present study, special emphasis is placed on the macromolecular composition of microalgae cells during a continuous cultivation with a light regime of 16 h day/8 h night at varying dilution rates ( $D_{\text{day}} = 0.0\text{--}1.0 \text{ d}^{-1}$  in steps of  $0.1 \text{ d}^{-1}$ ,  $D_{\text{night}} = 0.1 \cdot D_{\text{day}}$ ) each under steady-state conditions. Furthermore, the changes of the cellular composition and nutrient uptake during the absence of light were investigated. The main goal of this work is to prove that an intracellular starch buffer can supply microalgae cells with sufficient energy to enable nutrient uptake during night and therefore allow WWT also at the absence of natural light. Last, a theoretical strategy for an optimised continuous 24 h-WWT process is drawn using the aforementioned findings concerning the nighttime metabolism of the microalgae cells.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Algal strain, cultivation medium (synthetic WW), and cultivation system

Cultivation experiments were conducted using the green freshwater microalgae *Chlorella vulgaris* SAG 211-12 provided by the Culture Collection of Algae at Göttingen University (SAG). Synthetic WW (modified BG11 medium) was used as the medium (see Supplement). Compared to a standard BG11 medium, the N-source was changed to ammonium and all organic C-sources were eliminated. Furthermore, N and P concentrations in the medium ( $C_{N,Medium} = 200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $C_{P,Medium} = 44.15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) were adapted to generate a dry biomass concentration of  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , assuming an intracellular N and P content of 10%<sub>N</sub> and 2%<sub>P</sub>, respectively.

Continuous cultivation was performed in a commercial cylindrical 2 L model bioreactor system (KLF2000, Bioengineering AG, Switzerland) equipped with an illumination device (mounted LEDs with collimating lenses) constructed at our institute for homogenous light distribution within the culture broth (Jacobi et al., 2012). Light intensity applied was measured at the inner side of the glass cylinder using a planar quantum sensor (Light Meter Li250, LI-COR Environmental/Waltz). The photobioreactor system is equipped with several online analytic tools, including a pO<sub>2</sub> sensor (VISIFERM DO ARC 120, Hamilton Company), pH sensor (Easyferm Plus ARC 120, Hamilton Company), optical density sensor (Avaspec-3648, Avantes), as well as an exhaust gas analyser for O and CO<sub>2</sub> (Mулtor 610, Maihak AG). Temperature was controlled at 25.0 °C and pH was maintained at 7.5 using 1 M NaOH. The culture broth was continuously sparged with an aeration rate of 0.06 vvm using a mixture of air and CO<sub>2</sub> (95/5 v/v). Illumination was set to  $350 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  with a light/dark regime of 16 h/8 h. Prior to the continuous operation mode, a batch phase was carried out at the end of which (indicated by a constant dry biomass concentration) the sample point for  $D = 0.0 \text{ d}^{-1}$  was chosen. Afterwards, the continuous cultivation was started at fixed cultivation conditions (light, light regime, pH, temperature, aeration, and medium), applying a constant dilution rate during the day phase  $D_{\text{day}}$  (in  $\text{d}^{-1}$ ), lowering it during the night phase to  $D_{\text{night}} = 0.1\cdot D_{\text{day}}$ . Reducing  $D_{\text{night}}$  was chosen to prevent a biomass washout. Process parameters (pO<sub>2</sub>, optical density, exhaust gas composition) were then checked for reproducibility for at least five days to ensure steady-state conditions. At steady state, the reactor was sampled. After sampling, the dilution rate  $D_{\text{day}}$  was increased ( $D_{\text{night}}$  behaved accordingly) and the continuous cultivation continued at the new dilution rate. Again, samples were taken at steady-state conditions. Altogether, eleven dilution rates  $D_{\text{day}}$  at a range from  $0.0 \text{ d}^{-1}$  to  $1.0 \text{ d}^{-1}$  in  $0.1 \text{ d}^{-1}$  steps were applied consecutively. For each dilution rate tested, samples were taken during the light as well as throughout the dark phase (6 samples in total). After sampling, an aliquot of the culture broth was directly used to determine biomass concentration and for microscopy (see 2.2). Part of the remaining sample (~50 mL) was centrifuged (6900 rpm for 20 min at 4 °C) and the liquid fraction used to determine nutrient concentrations (see 2.3). The solid fraction was freeze dried to analyse the cellular lipid content (only for the first sampling point of  $D = 0.0\text{--}0.3 \text{ d}^{-1}$ ), lipid groups, and the N-content (each only for the first sampling point for all  $D$ 's applied). The remaining sample was aliquoted (1 mL) and centrifuged (11,000 rpm for 10 min at 4 °C). After removing the supernatant, samples were frozen until used for the determination of the macromolecular composition (lipids, carbohydrates, proteins, and pigments, see 2.3).

### 2.2. Measurement of biomass concentration and cell size

Dry biomass (DBM) concentration was measured as previously described (Ortiz Tena et al., 2021). A defined volume of a cell-containing sample was given on pre-washed and weighted glass microfibre filters with a nominal pore size of  $0.7 \mu\text{m}$  (50,698, No. 516-0346, VWR

International LLC.). After washing the cell-containing sample on the filter twice with deionised water, filters were dried in an oven at 105 °C for 8 h. For quantification, the filters were transferred to a desiccator and weighed (precision of  $\pm 0.01 \text{ mg}$ ). The dry biomass concentration was determined as the difference in weight of the filters with and without the cell-containing sample divided by the applied sample volume. Optical density was measured offline at 750 nm using a VIS-spectrophotometer (V-1200, Lambda 35, VWR/Perkin Elmer Inc.). A light microscope (Scope A1 Axio, Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH) was used to take pictures of the cells at each sampling point. Photos of the first sample of peach dilution rate were applied to determine the cell diameter using the ImageJ software.

### 2.3. Measurement of macromolecular and medium composition

Protein content of the cells was determined applying the Total Protein Kit (Micro Lowry, Peterson's Modification, TP0300-1KT) from Sigma Aldrich based on the Lowry reaction. To avoid interferences with EDTA present in the culture medium, high dilutions (>25-fold) were applied. Total carbohydrates in the biomass were measured employing the Anthrone method (Yemm and Willis, 1954) previously described in detail by Dillschneider et al., 2013. Intracellular chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, and carotenoid contents were quantified photometrically using the method developed by Wellburn in 1994 (Wellburn, 1994). Total lipids were determined gravimetrically after extraction using a mixture of chloroform and methanol (2,1 v/v). All measurements were carried out in triplicates. Main elements, i.e. C, N, S and H, were quantified using 2–4 mg of dry biomass by an element analyser (Vario Micro Cube, Elementar, Germany; reference measurement: sulfanilamide).

Nutrient concentrations were determined using ion chromatography (IC, 882 Compact IC plus, Metrohm) as well as the reflectometer RQflex® 20 (Supelco). Prior to both measurements, samples were filtered (cellulose filter,  $0.45 \mu\text{m}$ ) and diluted (IC: 1:10 automatically, reflectometer: 1:5 or 1:2 by hand) to ensure a cell-free supernatant. For reflectometric measurements, samples were prepared according to the manual in the corresponding kit (test strips, Supelco) for ammonium-nitrogen (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N, measurement ranges:  $0.7\text{--}7.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $5.0\text{--}20.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , and  $20\text{--}180 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and total phosphorus (TP, measurement ranges:  $0.1\text{--}5.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  and  $5\text{--}120 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). A conductivity detector (Metrohm) was used for IC measurements, samples were injected by an autosampler unit (885 Professional Sample Processor, Metrohm). For anions (Cl<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>), the stationary phase was a Metrosep A Supp 5 column (150/4, Metrohm), elution buffer consisted of 3.2 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1.0 mM NaHCO<sub>3</sub>, and 12.5 % (v/v) acetonitrile in water. The stationary phase for cations was a Metrosep C4 column (150/4.0, Metrohm), the eluent was a mixture of 1.7 mM HNO<sub>3</sub> and 0.7 mM 2,6-pyridinedicarboxylic acid.

### 2.4. Calculations

To evaluate the macromolecular composition of the microalgae biomass (BM) under different conditions, the quota of the cellular macromolecules (Mm) (proteins (Prot), carbohydrates (Carb), nucleic acids (Nuca: DNA and mainly RNA), (phospho-)lipids (Lipid) and pigments measured as chlorophyll (Chl)) were defined using Eq. (2-1). The concentration of the Mms ( $c_{Mm}$ ) is obtained from the respective detection methods.

$$q_{Mm,BM} = \frac{c_{Mm}}{c_{BM}} \quad (2-1)$$

The sum of all cellular Mms of DBM was >100 %, therefore a normalisation to 100 % was undertaken. The measurement of the total lipid content of the DBM was only possible for  $D = 0.0\text{--}0.3 \text{ d}^{-1}$ . For all other samples,  $q_{Lipid}$  was set equal to the residual fraction, generated under the assumption that all macromolecules add to 100 % after normalisation.

The interpretation of changes in the macromolecular composition of

the dry biomass is supported by employing the concept of active biomass (ABM). This was introduced firstly by the need to quantify the mass of metabolic cells in wastewater sludge and later taken up by bioprocess modelling. There it refers to the portion of the overall biomass that is currently metabolically active and contributing to the breakdown and removal of pollutants from the wastewater (Cronje et al., 2002). Later it was used to distinguish between heterotrophic and autotrophic biomass in sludge (Shoener et al., 2019). The concept was further refined by O. Bernard to distinguish in modelling between biomass proliferation in the sense of cell growth and cell division from biomass increase by accumulation of starch (Bernard, 2011). There is understood as the mass of slightly light-limited microalgal cells without storage compounds. It is first time used in this paper to estimate the amount of storage compounds in the context of determination of biomass composition.

The definition of the active biomass (ABM) in this paper is based on assumptions regarding variable intracellular macromolecular pools. The macromolecular composition in this regard includes proteins (Prot), pigments (quantified as chlorophyll (Chl)), nucleic acids (NucA), carbohydrates (Carb), and lipids (Lipid). Carbohydrates and lipids are further divided into functional (mainly structural) and storage fractions. However, these fractions cannot be distinguished by measurements directly but are estimated here by ABM with the given assumptions. By subtracting the active biomass, those storage components can be quantified/determined as shown in the following paragraph. Furthermore, ABM reacts to changing environmental conditions.

The first choice for an assumption on ABM composition is based on measured (meas) quotas in BDM  $q_{Mm,BDM,meas}$ . That has been done for proteins and pigments, separately for each D. Further assumptions are based on stoichiometric relations between the Mm. In the case applied here, quota of nucleic acids was set to 10 % of protein quota. Structural carbs and lipids and the respective storage compounds can only be separated by assumptions for the structural elements. From the data presented in this study,  $q_{Carb,ABM,est}$  is set to 14 %. This value represents the minimum for fast unlimited growth without accumulation of storage compounds. Furthermore, a constant quota of 5 % lipids for the ABM is presumed. The setup of the composition of a theoretical active biomass cell including references is summarised in Table 3-1. In investigations with fewer available measurements, the Redfield ratio can also be applied for an estimation of e.g. phospholipids or nucleic acids. In the choices given above, the Redfield ratio of C:N:P = 106:16:1 is actually nearly fulfilled intrinsically.

For the final estimation of the active biomass composition and the amount of storage material, the measured quotas  $q_{Mm,DBM,meas}$  have to be transformed into the quotas of the active biomass  $q_{Mm,ABM,est}$  (est: estimated) together with the estimated values for the storage compounds  $q_{Carb,sto,est}$  and  $q_{Lipid,sto,est}$  respectively. A normalisation factor  $f_{norm}$  can be found by solving the normalisation equation under the constraint of the preset values for structural carbohydrates and lipids in the ABM (Eq. (2-2)):

$$\sum q_{Mm,ABM,est} = 1; q_{Mm,ABM,est} = q_{Mm,DBM,meas} \cdot f_{norm}; q_{Carb,ABM,est}, q_{Lipid,ABM,est} \text{ fixed} \quad (2-2)$$

The normalisation factor  $f_{norm}$  is then given by Eq. (2-3):

$$f_{norm} = \frac{1 - q_{Carb,ABM,est} - q_{Lipid,ABM,est}}{q_{Prot,DBM,meas} + q_{NucA,DBM,meas} + q_{Chl,DBM,meas}} \quad (2-3)$$

This allows the estimation of the ABM in a re-normalised form:

$$q_{Mm,ABM,est} = f_{norm} \cdot q_{Mm,DBM,meas} \quad (2-4)$$

The estimated storage compounds virtually related to ABM are (Eqs. (2-5) and (2-6)):

$$q_{Carb,sto,est} = \frac{(1 - q_{Lipid,ABM,est}) \cdot q_{Carb,DBM,meas} - (1 - q_{Lipid,DBM,meas}) \cdot q_{Carb,ABM,est}}{q_{Prot,DBM,meas} + q_{NucA,DBM,meas} + q_{Chl,DBM,meas}} \quad (2-5)$$

$$q_{Lipid,sto,est} = \frac{(1 - q_{Carb,ABM,est}) \cdot q_{Lipid,DBM,meas} - (1 - q_{Carb,DBM,meas}) \cdot q_{Lipid,ABM,est}}{q_{Prot,DBM,meas} + q_{NucA,DBM,meas} + q_{Chl,DBM,meas}} \quad (2-6)$$

The concentration of ABM is then calculated from BDM as (Eq. (2-7)):

$$c_{ABM} = \frac{c_{BDM}}{1 + q_{Carb,sto,est} + q_{Lipid,sto,est}} \quad (2-7)$$

The influence of light on the cellular composition is evaluated by the amount of absorbed photons (= specific photon uptake rate  $r_{Ph,abs}$  in  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) using Eq. (2-8), applying the reactor volume ( $V_{Reactor}$ ), the illuminated surface ( $A_{illuminated}$ ), and the light intensity applied  $I_0$ .

$$r_{Ph,abs} = \frac{I_0 \cdot A_{illuminated}}{c_{BM} \cdot V_{Reactor}} \quad (2-8)$$

In a continuous cultivation in chemostat, the dilution rate (D) in  $\text{d}^{-1}$  is equivalent to the specific growth rate ( $\mu$ ) at steady-state, being defined in Eq. (2-9) by the inflow rate ( $\dot{F}_{in}$ ) and the reactor volume ( $V_{Reactor}$ ).

$$D = \frac{\dot{F}_{in}}{V_{Reactor}} \quad (2-9)$$

The nitrogen content ( $q_N$ ) of the biomass was determined in three different ways: A direct measurement allows to quantify  $q_{N,meas,DBM}$ ,  $q_{N,meas,ABM}$  was calculated from this value. Nitrogen uptake from the medium per gram BM was used to determine  $q_{N,calc,BM}$ . For the calculation of  $q_{N,th,BM}$ , it is assumed that all intracellular nitrogen is located either in the protein or pigment fraction.

$$q_{N,meas,ABM} = \frac{c_{ABM} \cdot q_{N,meas,DBM}}{c_{DBM}} \quad (2-10)$$

$$q_{N,calc,BM} = \frac{c_{N,Medium} - c_{N,residual}}{c_{BM}} \quad (2-11)$$

$$q_{N,th,BM} = q_{Prot,BM} \cdot q_{N,Prot} + q_{Chl,BM} \cdot q_{N,Chl} \quad (2-12)$$

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Nutrient uptake, growth behaviour, and changes in biomass composition during illumination for different dilution rates

Optimal WWT using microalgae is the subject of numerous recent and previous investigations (Chai et al., 2021; Luo et al., 2017; Mat Aron et al., 2021). Nevertheless, there is a lack of studies cultivating microalgae continuously as the process strategy is mostly limited to batch or semi-batch operations. During continuous cultivation with constant light energy (chemostat), nutrient uptake and the corresponding macromolecular composition can be correlated to the dilution rate applied (Dickinson et al., 2013; Samorì et al., 2014). This happens in a feed-back loop, where nutrient supply as a direct effect of D and nutrient uptake as a direct effect of current surrounding concentrations are counteracting until the equilibrium  $\mu = D$  is reached.

**Table 3-1**

Macromolecular and elemental composition of major compounds of the active biomass (ABM) of *Chlorella*. The calculated values are within the ranges given by Inomura et al., 2020, Ågren, 2004 and Geider and La Roche, 2002.

Macromolecule	$q_{C,Mm}$	$q_{N,Mm}$	$q_{P,Mm}$	$q_{Mm,ABM}$
Proteins	0.533	0.158	0.000	0.690
Nucleic acids	0.340	0.155	0.091	0.070
(Phospho-)lipids	0.640	0.000	0.043	0.050
Carbohydrates	0.400	0.000	0.000	0.140
Pigments (Chl)	0.740	0.063	0.000	0.050
Active biomass	0.523	0.0922	0.0127	1.000

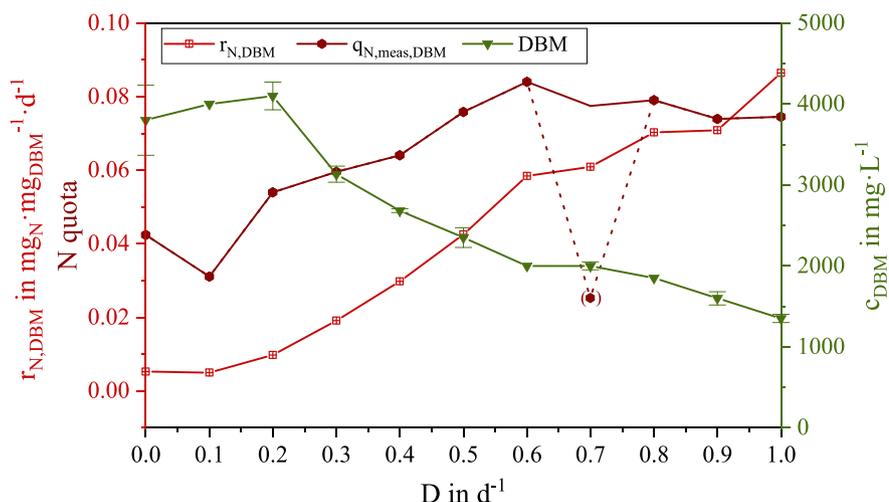
For all dilution rates applied ( $D_{\text{day}} = 0.0\text{--}1.0\text{ d}^{-1}$  in  $0.1\text{ d}^{-1}$ -steps,  $D_{\text{night}} = 0.1 \cdot D_{\text{day}}$ ), various parameters were quantified, each 30 min before the night phase started: Nutrient concentrations in the reactor (N and P) were measured, allowing to evaluate the nutrient uptake ( $r_{N, \text{DBM}}$ , Fig. 3-1 A). Furthermore, dry biomass concentration ( $c_{\text{DBM}}$ ) and its N-content  $q_{\text{N}}$  (Fig. 3-1 A), macromolecular composition (Fig. 3-1 B and C), cell size (Fig. S2), and lipid groups (see Fig. S1 in Supplement) are compared.

Under the regime of low D's ( $D \leq 0.2\text{ d}^{-1}$ ), nutrient limitations usually cause the corresponding low specific growth rates. Higher growth rates are thus only possible as nutrient supply increases with rising D. However, rising growth rates also require growing photon availability per cell. Above a certain D, biomass concentration decreases until photon availability is high enough to support the higher  $\mu$ , subsequently increasing nutrient availability per cell. From the experimental data in Fig. 3-1 A, this threshold point is reached for  $D = 0.3\text{ d}^{-1}$ . For  $D \leq 0.2\text{ d}^{-1}$ , nutrient limitations limit dry biomass concentration to  $\sim 4000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . An increase in D decreases DBM and increases nutrient availability per cell at the same time, reducing nutrient limitations and induces changes in the macromolecular composition (Fig. 3-1 B). Medium D's ( $0.3\text{ d}^{-1} \leq D \leq 0.6\text{ d}^{-1}$ ) are therefore characterised by an interplay of nutrient and light limitations. At high D's ( $D \geq 0.7\text{ d}^{-1}$ ),

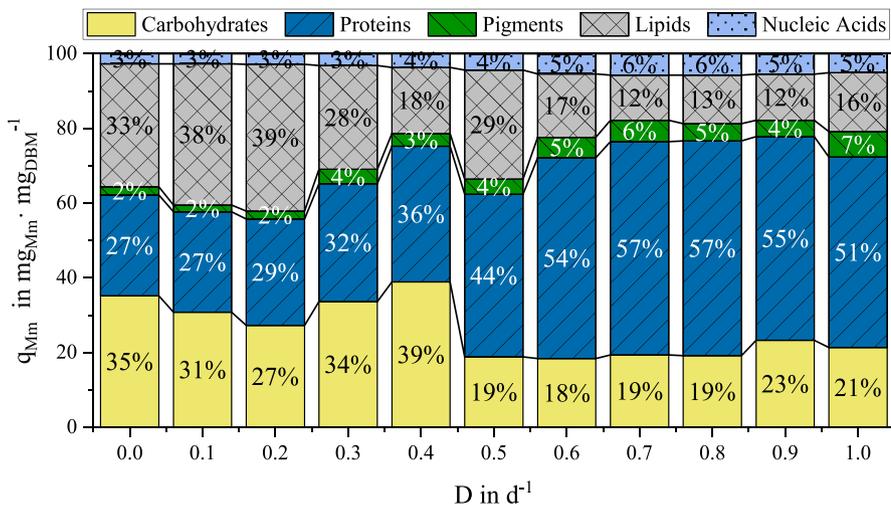
light limitation becomes more and more dominant until photon availability reaches the level for maximum specific growth rate.

When applying low dilution rates, surplus light is used in the non-limiting photosynthesis to synthesize and accumulate storage compounds, i.e. starch and unipolar lipids (TAG) at nitrogen limitation (Cha et al., 2021; Janssen et al., 2018). Consequently, the quota of storage components (carbohydrates + lipids) persists at  $\sim 70\%_{\text{DBM}}$  for low D's, representing the upper limit of the storage capacity potential (Safi et al., 2014; Schediwy et al., 2019). As neither N nor P as detected in the reactor outflow, a co-limitation of both nutrients is assumably, characterizing DBM by low intracellular protein ( $27\text{--}29\%_{\text{DBM}}$ ) as well as pigment content ( $2\%_{\text{DBM}}$ ) (Fig. 3-1 B).

For medium D's ( $D = 0.3\text{--}0.6\text{ d}^{-1}$ ), enhanced nutrient uptake per cell ( $r_{N, \text{DBM}}$  in Fig. 3-1 A) and thus rising the intracellular N content from 5.95 to  $8.40\%_{\text{DBM}}$  reflect diminishing nitrogen limitation, reflected by a high starch production up to  $39\%_{\text{DBM}}$  and moderate lipid accumulation ( $18\text{--}28\%_{\text{DBM}}$ ) at  $D = 0.3\text{--}0.4\text{ d}^{-1}$ . Both dilution rates are characterised by a low and steady pigment quota of  $3\text{--}4\%_{\text{DBM}}$ . For  $D \geq 0.5\text{ d}^{-1}$ , a drop in the carbohydrate content of DBM is visible indicating the change in the limiting situation towards light limitation emphasised by an increase in the pigment and protein quota from 4 to  $5\%_{\text{DBM}}$  and 44 to  $54\%_{\text{DBM}}$ , respectively (Fig. 3-1 B). A sufficient N supply allows the processing of



A



B

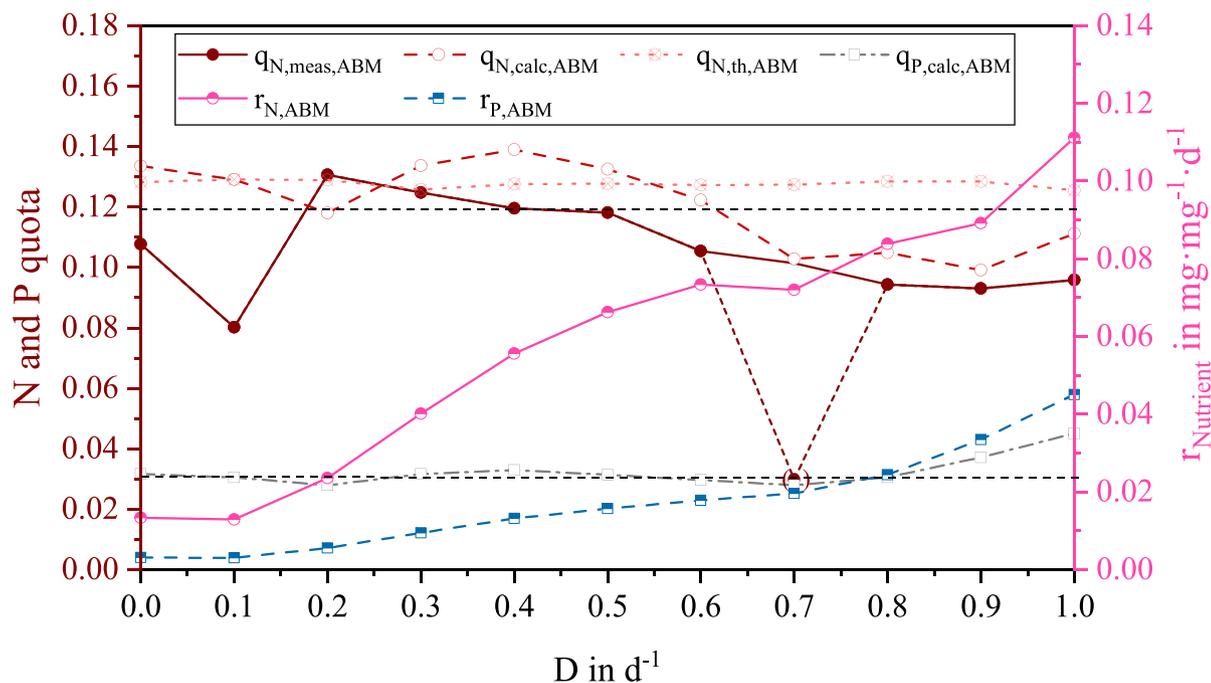
**Fig. 3-1.** Characterisation of DBM of *Chlorella vulgaris* cells during a continuous cultivation with synthetic WW at an increasing D ( $D_{\text{day}} = 0.1\text{--}1.0\text{ d}^{-1}$  in  $0.1\text{ d}^{-1}$ -steps,  $D_{\text{night}} = 0.1 \cdot D_{\text{day}}$ ): Intracellular N content ( $q_{\text{N, meas, DBM}}$ ) together with N uptake rate ( $r_{\text{N, DBM}}$ ) and photon absorption rate ( $r_{\text{Ph, abs, DBM}}$ ) (A), as well as the DBM concentration and its macromolecular composition (quotas of carbohydrates, proteins, pigments, lipids, and nucleic acids) (B). Measured value for the N quota of sample from  $D = 0.7\text{ d}^{-1}$  is declared as an outlier.

intracellular carbohydrates (nearly no storage) as well as the production of more photosynthetically active proteins and subsequently chlorophylls to absorb all photons available (Benvenuti et al., 2015). Nevertheless, the residual fraction is attributed to lipids as nitrogen is still nearly fully consumed.

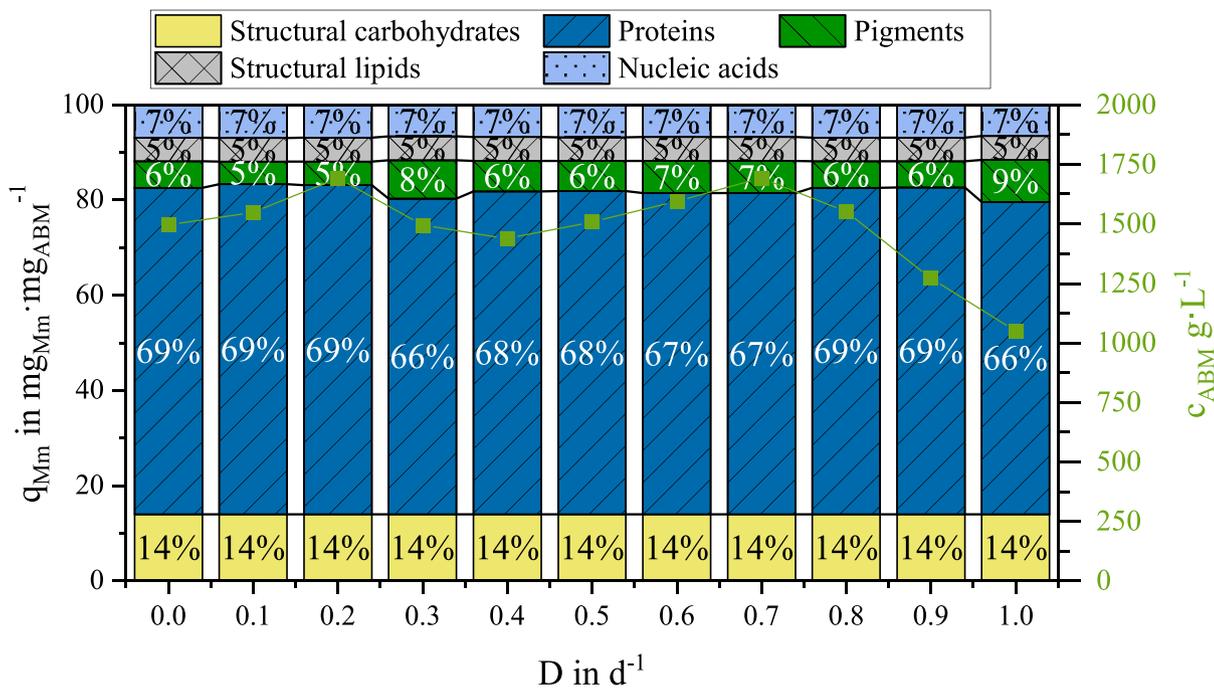
Algae cells at high dilution rates ( $D \geq 0.7 \text{ d}^{-1}$ ) are characterised by a stable N-content of  $\sim 7.75\%_{\text{DBM}}$  and a low content of storage components of  $\sim 30\%_{\text{DBM}}$ . This is driven by a rising specific nitrogen uptake rate  $r_{\text{N,DBM}}$  according to the rising specific growth rate (Fig. 3-1 A).

Nevertheless, a slight decrease in the pigment content is visible (from 6 to  $4\%_{\text{DBM}}$  between  $D = 0.7$  and  $0.9 \text{ d}^{-1}$ ), which may be caused by an already high light availability. For very high dilution rates ( $D = 0.9$  and  $1.0 \text{ d}^{-1}$ ), no trends are obvious. Although  $c_{\text{DBM}}$  was stable for a couple of days for  $D = 1.0 \text{ d}^{-1}$ , this dilution rate is presumably already within the wash-out region.

For  $D \geq 0.6 \text{ d}^{-1}$  the residual N content in the medium increased, whereas P was below the limit of detection for all D's tested. This marks the system's upper limit of nitrogen removal. As the N:P ratio in the



A



B

Fig. 3-2. Characterisation of ABM of *Chlorella vulgaris* cells during a continuous cultivation with synthetic WW at an increasing  $D$  ( $D_{\text{day}} = 0.1\text{--}1.0 \text{ d}^{-1}$  in  $0.1 \text{ d}^{-1}$  steps,  $D_{\text{night}} = 0.1 \cdot D_{\text{day}}$ ): Intracellular N and P content ( $q_{\text{N,ABM}}$  and  $q_{\text{P,ABM}}$ ) together with nutrient uptake rates ( $r_{\text{N,ABM}}$  and  $r_{\text{P,ABM}}$ ) (A), as well as the ABM concentration and its macromolecular composition (quotas of carbohydrates, proteins, pigments, lipids, and nucleic acids) (B).  $q_{\text{N,meas,ABM}}$  of sample for  $D = 0.7 \text{ d}^{-1}$  is declared as outlier.

synthetic WW was 9.34:1, the total P uptake can only be explained by luxury uptake and subsequent P storage as polyphosphate, demonstrating the aforementioned ability of *Chlorella vulgaris* to overcome the strict Redfield ratio of 16:1. The resulting consequences of the nutrient uptake capacity at different D's for a continuous WWT process will be discussed in Section 3.5.

### 3.2. Concept of active biomass applied to evaluate the continuous cultivations

For a deeper understanding of the microalgae metabolism, the active biomass (ABM, DBM without storage components) concentration ( $c_{ABM}$ ) and its molecular composition, nutrient uptake, and quota were quantified in Fig. 3-2 A and B.

As discussed in Section 3.1, light limitation is the dominant regime for  $D \geq 0.7 \text{ d}^{-1}$ . Nutrient limitations (mainly N) affect the BM concentration and macromolecular composition prior to this growth rate. As a result,  $c_{ABM}$  remains – in analogy to heterotrophic cultivations – approximately constant for  $D \leq 0.6 \text{ d}^{-1}$  (Fig. 3-2 A) as the supply of (a) limiting dissolved substrate (s) increases with rising D resulting in a constant availability per cell. To maintain high D's of  $\geq 0.7 \text{ d}^{-1}$ , microalgae cells need a specific photon energy input per cell. For constant illumination, this means that  $c_{ABM}$  decreases until that need is satisfied. The system's behaviour marks the major difference between phototrophic and heterotrophic continuous cultivations.

In contrast to DBM, only slight variations in the macromolecular composition of ABM are visible (Fig. 3-2 B). ABM has been defined by constant quotas of structural polysaccharides (14 %) and cell membrane lipids (5 %) that were used as calibration values to quantify its concentration (see Eq. (2-7)). An increase in the pigment quota from 6 to 9%<sub>ABM</sub> can be observed with a higher D, which goes hand in hand with the growing energy demand of the cells. Intracellular protein content varies between 66 and 69%<sub>ABM</sub>, implying a constant protein demand that is always realised in healthy, growing cells. This is in contrast to the often stated reduction of protein content at N limitation (Arora et al., 2016; Beuckels et al., 2015; Dickinson et al., 2013; Samorì et al., 2014), which can be attributed to a “dilutive” effect of building-up storage components within the cell. A reduction of protein synthesis at nitrogen limitation is known from literature (Brányiková et al., 2011; Breuer et al., 2014; Janssen et al., 2018) but is not visible in the data presented here. Furthermore, a stoichiometric relationship between chlorophylls and photosynthetically active proteins is proven (Janssen et al., 2018). Light limitation is usually responded to by microalgae cells by expanding the photosynthetic apparatus including pigments and light harvesting proteins (Benvenuti et al., 2015; Janssen et al., 2018). But at the same time, proteins for electron transport and anabolism are reduced (Inomura et al., 2020), summing up to a net constant protein quota. The constant protein content is thus discussed as a constant space demand of the protein molecules within the microalgae cell (Burnap, 2015). The water-free storage molecules require far less space for the same weight. The constant quota of nucleic acids (~7%<sub>ABM</sub>) is a result of its quantification definition as 10 % of the equally stable protein content.

Intracellular nitrogen content ( $q_N$ ) was determined using three independent approaches; firstly by a direct measurement ( $q_{N,meas,ABM}$ ), secondly using the nitrogen uptake from the medium ( $q_{N,calc,ABM}$ ), and thirdly as the sum of the theoretical N quota of the protein, pigment, and nucleic acid fraction ( $q_{N,th,ABM}$ ). Although originating from different measurements with varying precisions, all N contents show a similar pattern: fluctuations around an average intracellular nitrogen value of ~11.94 % (Fig. 3-2, dashed black line). For  $q_{N,meas,ABM}$  and  $q_{N,calc,ABM}$ , a slight downward tendency is visible at high D's, but its exact biological significance is unclear. We conclude a constant nitrogen demand of microalgae cells (without N-free storage molecules) that needs to be satisfied regardless of the surrounding nutrient concentrations. Furthermore, no storage of nitrogen even at high N concentrations is possible, otherwise an increase of the intracellular N quota would be

detectable.

P uptake ( $r_{P,ABM}$ ) is constantly increasing with rising D's. The intracellular P quota ( $q_{P,calc,ABM}$ ) could only be determined using the residual P concentration in the outflowing medium (below the limit of detection for all D's applied). The quota is steady for  $D \leq 0.8 \text{ d}^{-1}$  at ~3.05%<sub>ABM</sub> (Fig. 3-2, black polyline), but apparently enhances at very high D's up to 4.5%<sub>ABM</sub>. Again, it is difficult to evaluate data for  $D \geq 0.9 \text{ d}^{-1}$  due to a possible influence of wash-out phenomena. The resulting intracellular N:P ratio of ~3.9:1 is lower than reported for *Chlorella* (~6:1 to 10:1 by Beuckels et al., 2015). This can be explained by the increasing ribosomal RNA content and the P storage in granules due to luxury uptake.

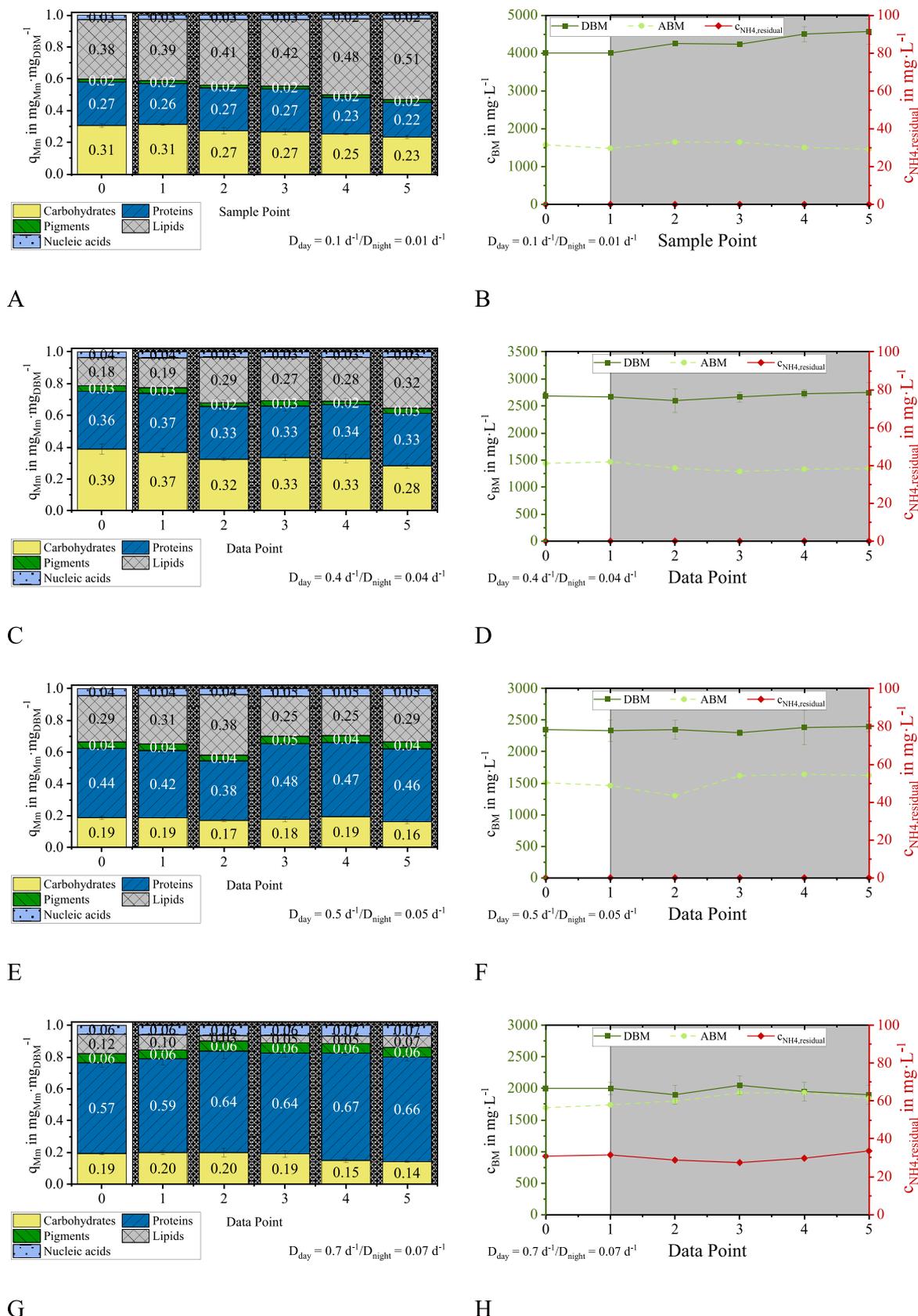
Cell size was measured for all dilution rates applied. Fig. S2 in Supplement shows that N-limited cells ( $D = 0.0\text{--}0.5 \text{ d}^{-1}$ ) are characterised by a reduced cell diameter compared to light-limited cells ( $D = 0.6\text{--}1.0 \text{ d}^{-1}$ ). The accumulation of water-free lipids due to a lack of N reduces cell diameter compared to cells with higher protein quotas, which was also observed by Arora et al., 2016.

### 3.3. Evaluation of microalgae growth and composition during dark (night) periods

Little is known about metabolic activities of microalgae cells at the absence of light so far. Often, an unwanted reduction of biomass up to 22 % throughout the night is observed being associated with the light availability during the day period, as it influences the accumulation of intracellular storage components (Doucha and Lívanský, 1995; Edmundson and Huesemann, 2015; León-Saiki et al., 2017; Ogbonna and Tanaka, 1996; Torzillo et al., 1991). These serve as major transient energy storage (TES) component for microalgae (León-Saiki et al., 2017) and are discussed to be metabolized during the night. Provided that nitrogen is taken up, the formation of protein is observed. (Edmundson and Huesemann, 2015; Lu et al., 2005; Ogbonna and Tanaka, 1996) However, the concept of active biomass (DBM without storage components) has not been applied to evaluate the results of the aforementioned studies that usually quantify cell loss based on DBM concentrations. This does not allow to distinguish between the decrease of intracellular starch or a decline in cell number. Furthermore, nutrient uptake during the absence of light has not been investigated at all so far. Therefore, a special emphasis was placed on the metabolic activities including macromolecular changes and nutrient consumption of the microalgae cells in the present study, evaluated using the active biomass as an additional parameter. For all dilution rates tested (see chapter 3.1), the corresponding night phase was sampled. The dilution rate during the dark period  $D_{night}$  was reduced to 10 % of  $D_{day}$ , resulting in a slight nutrient supply increasing with rising dilution rates. Due to the construction of the PBR system and sampling, there was only an inflow of medium during the dark period, implying a fed-batch mode during the night. The sample points throughout the night phase are defined as “data points” and numbered consecutively. The corresponding timeline is the following: data point 0 was collected 0.5 h before the beginning of the dark phase, data point 1 0.5 h, data point 2 2 h, data point 3 4 h, data point 4 6 h, and data point 5 7.5 h after the beginning of the dark phase.

Phosphorus wasn't detected in the reactor outflow during the night period for all D's tested. Residual nitrogen was detected for  $D \geq 0.6 \text{ d}^{-1}$  (increasing concentration with rising D) from data point 0 on throughout the whole night. N uptake was measurable at the absence of light and will be discussed in the following paragraphs in detail. The pigment content only showed slight fluctuations during the night periods for all D's tested and can thus be regarded as stable throughout a dark period of 8 h.

For very low dilution rates ( $D_{day} = 0.0, 0.1, \text{ and } 0.2 \text{ d}^{-1}$ , shown as an example for  $D_{day} = 0.1 \text{ d}^{-1}$  in Fig. 3-3), there was a reduction of the carbohydrate content concomitantly with an increase of the lipid fraction. The absence of nitrogen (see  $c_{NH4,residual}$  in Fig. 3-3 B) induces the conversion of the transient energy storage starch to long-term storage



**Fig. 3-3.** Biomass composition (carbohydrates, proteins, pigments, and residual) and biomass concentration (active biomass and DBM) of *Chlorella vulgaris* as well as residual  $\text{NH}_4$  concentration in the photobioreactor during the day and night phase for a dilution rate of  $D = 0.1 \text{ d}^{-1}$  (A&B),  $D = 0.4 \text{ d}^{-1}$  (C&D),  $D = 0.5 \text{ d}^{-1}$  (E&F) and  $D = 0.7 \text{ d}^{-1}$  (G&H). The dilution rate during the dark period was reduced to 10 % of the day value.

lipids (Breuer et al., 2014), resulting in a constant storage quota of  $\sim 68\%_{\text{DBM}}$ . No proliferation is indicated by the progress of active biomass concentration, which can be explained by the severe nitrogen limitation that does not meet the cell's minimum N demand required for growth (Franks et al., 2022). A similar trend is observed for  $D = 0.3 \text{ d}^{-1}$  (see Fig. S3 C in Supplement), but storage components only make  $\sim 62\%_{\text{DBM}}$ .

For  $D = 0.4 \text{ d}^{-1}$ , microalgae cells are released into the night phase with a comparably high carbohydrate content of  $39\%_{\text{DBM}}$ , which reduces by 28.2 % throughout the dark period to  $28\%_{\text{DBM}}$  (Fig. 3-3 C). Furthermore, the lipid fraction increases by  $\sim 1.7$ -fold. Only slight fluctuations of both  $c_{\text{DBM}}$  and  $c_{\text{ABM}}$  are visible in Fig. 3-3 D. Nevertheless, the reduction of proteins of  $\sim 10.8$  % from data point 1 to 2 indicates proliferation  $\sim 2$  h after the dark phase began as microalgae cells do not actively reduce their macromolecular contents but dilute it via growth (Breuer et al., 2014). Afterwards, protein content remains constant, probably due to nitrogen limitation. However, cell division cannot be proven by an increase in  $c_{\text{ABM}}$ .

In contrast, the carbohydrate content of cells with  $D = 0.5 \text{ d}^{-1}$  is low, but the build-up of protein at the cost of carbohydrates can be assumed. The conversion of carbohydrates to lipids is not assumed as the limiting situation is already changing from nitrogen to light limitation. Again, cell division is assumed at data point 2, indicated by the consecutive reduction and build-up of proteins and carbohydrates (Fig. 3-3 E), supported by an increase in  $c_{\text{ABM}}$  (Fig. 3-3 F). Synthesis of proteins (increase of  $\sim 20.8$  %) after cell division (data point 3) is probably due to a higher nitrogen availability compared to  $D = 0.4 \text{ d}^{-1}$  (Brányiková et al., 2011). Data for  $D = 0.6 \text{ d}^{-1}$  (Fig. S3 D in Supplement) show a similar trend, growth takes place after approximately 4–6 h of the night phase.

A small carbohydrate buffer of  $19\%_{\text{DBM}}$  was measurable for cells at  $D = 0.7 \text{ d}^{-1}$ . The reduction of storage components (carbohydrates + lipids) of 32.3 % during the night allows for an increase in protein content (10.6 %, data points 1 to 5 in Fig. 3-3 G) that goes along with a consumption of residual nitrogen in the medium (reduction by 8.2 %) within the first 4 h of the night phase (data points 1 to 3, Fig. 3-3 H). Cell division seems to take place as an increase in  $c_{\text{ABM}}$  from data point 1 to 3 is visible. After that, the energy buffer of the cells seems to be too low to allow metabolic activities such as nitrogen uptake. In contrast to nitrogen-limited cells, the reduction of proteins after supposed cell division is not visible at an N surplus as the protein quota remains constant (Fig. 3-3 G).

For very high dilution rates (see Fig. S3 E-G in Supplement), algae cells are released into the night with a small carbohydrate buffer of  $\sim 20.6\%_{\text{DBM}}$ . Nitrogen uptake is measurable within the first four and two hours of darkness for  $D = 0.9 \text{ d}^{-1}$  and  $D = 1.0 \text{ d}^{-1}$ , respectively. The slightly increasing nitrogen concentration in the PBR afterwards can be attributed to the constantly inflowing medium. Protein concentration rises accordingly as the following reduction of the protein quota indicates cell division, which cannot be confirmed by the progress of  $c_{\text{ABM}}$ . Furthermore, metabolic activities seem to pause towards the end of the night phase. As already mentioned, all trends for very high D's might be attributed to wash-out.

No decline in  $c_{\text{DBM}}$  was measurable throughout the night phase for all dilution rates tested. Usually, biomass reduction during the dark phase is positively correlated to the starch content of the microalgae cell (León-Saiki et al., 2017; Torzillo et al., 1991). This is in line with our results as the reduction of carbohydrates reached its maximum during the dark phase of  $D = 0.4 \text{ d}^{-1}$ , at which cells had the highest starch quota. Corresponding to our model, the intracellular energy buffer can be used for anabolic activities during the absence of light, the extent of depletion depending on its quantity. In addition, the data presented revealed an impact of the nutrient availability on the metabolic activities during the night. At severe N limitation ( $D = 0.0$ – $0.2 \text{ d}^{-1}$ ), no proliferation or protein synthesis takes place, but there is a conversion of short-term energy storage starch to long-term storage lipids. If the minimum

nitrogen demand of the algal cells can be responded to ( $D = 0.3$ – $0.6 \text{ d}^{-1}$ ), proliferation occurs at the expense of the carbohydrate quota. At an N surplus ( $D = 0.7$ – $0.8 \text{ d}^{-1}$ ), protein synthesis is measurable in addition to growth. Keeping those findings in mind, the influence of the growth phase on the nocturnal biomass decline that has been often stated can be revealed: Ogbonna and Tanaka (1996) discovered the highest metabolic activities during darkness for cells in the exponential growth phase, characterised with the lowest carbohydrate content compared to microalgae in the linear and stationary growth phase. However, the authors did not consider the availability of nitrogen in the medium that allowed a maximum  $c_{\text{DBM}}$  of  $\sim 1.7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , assuming  $q_{\text{N}} = 10\%_{\text{DBM}}$ . This value was already exceeded during the linear growth, resulting in a plateau at the stationary phase indicating N limitation. The very probable nutrient restraint can explain the reduced metabolic activities for the night phase of cells in the linear and stationary growth phase.

For nearly all D's tested, biomass growth presumably takes place after approximately 2 h after the night phase begins. Proliferation is underlined by both, an increase in  $c_{\text{ABM}}$  as well as a drop in protein content, followed by an increase under non-limiting conditions regarding nitrogen. Those findings can be attributed to the so-called diurnal clock of microalgae cells. Pursuant to this concept, algae cells have an internal clock to which the cell cycle is adapted. Several studies have already proven that cell division mostly takes place at the absence of light but is not hindered under permanent illumination (Kato et al., 2019).

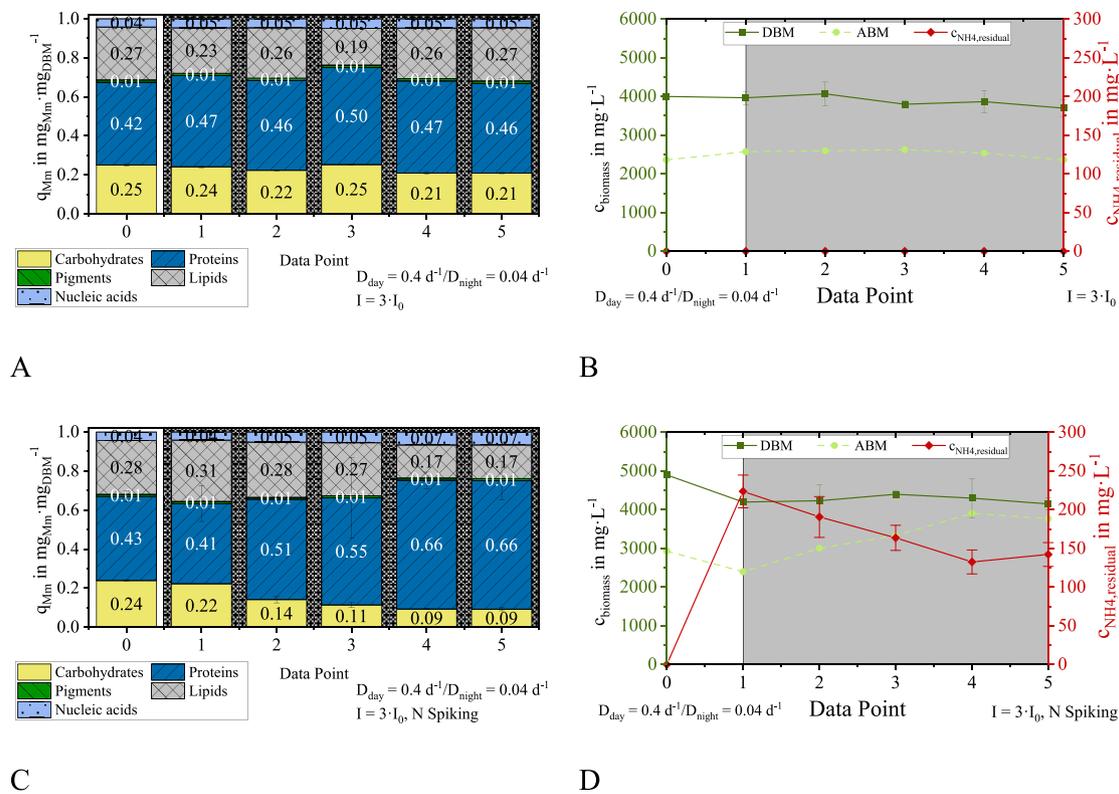
Furthermore, the results indicate a reduction of metabolic activities at around 6 h of darkness for all dilution rates applied. This phenomenon has already been described in plants for starch degradation during the night, where related gene transcripts decline within the first 9 h of darkness (Lu et al., 2005). Nevertheless, further experiments would be necessary to investigate those relations for microalgae.

Summing up, three main findings can be concluded: (i) under N limitation, transient energy storage starch is converted to lipids during the absence of light, (ii) the carbohydrate buffer of microalgae cells can be respired to provide energy for protein synthesis in the dark period when sufficient N supply is provided, and (iii) the N uptake takes place even at the absence of light. Furthermore, cell division presumably takes place at around 2 h after the dark phase begins.

### 3.4. N spiking experiment for starch degradation

N uptake, protein synthesis, and growth at the cost of the intracellular energy buffer starch could be proven by means of the results demonstrated above. Nevertheless, the nutrient uptake potential cannot be quantified as comparably low residual N concentrations were present for D's at which metabolic activities took place. As already concluded, very high D's ( $D = 0.9$ – $1.0 \text{ d}^{-1}$ ) were too close to the system's wash-out point to be considered for an optimised WWT strategy. Therefore, the experiment described above was repeated under more informative conditions. To exclude light limitations, the light intensity was increased 3-fold to  $1050 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , all other parameters were configured similarly. The continuous cultivation was run at  $D = 0.4 \text{ d}^{-1}$  because cells at this dilution rate had the highest carbohydrate content and N limitation was already tapering at the corresponding nutrient supply. At first, the night phase was sampled according to the prior experiments to evaluate the "baseline" activities of the microalgal cells under these conditions. On the second sampling day, N was added at the beginning of the dark period (data point 1) to achieve a reactor concentration of  $c_{\text{NH}_4} = 220 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Higher photon availability reduces the pigment content of the microalgae cells to  $\sim 1$  % and increases the lipid fraction at the cost of the starch content (Fig. 3-4 A&B). The severe light surplus led to a shift in the storage components towards lipids, storage components make up to  $\sim 52\%_{\text{DBM}}$ . Protein content increased to  $\sim 42\%_{\text{DBM}}$  compared to the low-light approach. Without N supplementation, metabolic activities

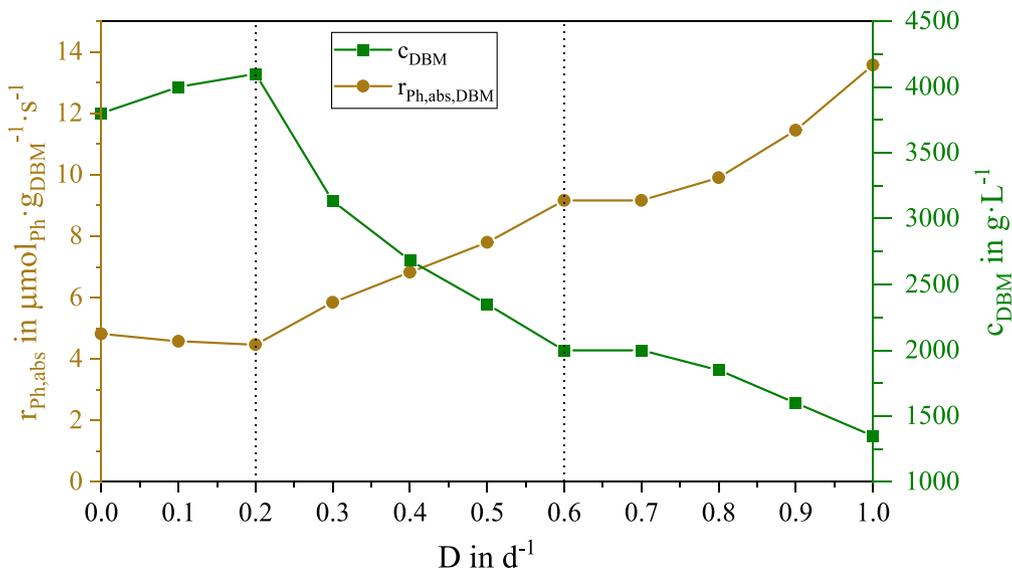


**Fig. 3-4.** Biomass composition (carbohydrates, proteins, pigments, and residual) and concentration (ABM and DBM) of *Chlorella vulgaris* as well as residual NH<sub>4</sub> concentration in the PBR during the day and night phase for  $D = 0.4 \text{ d}^{-1}$  (A&B),  $D$  during the dark period was reduced to 10 % of the day value. In a second approach, N was supplied to the PBR prior to the night phase (C&D).

resemble to the aforementioned behaviour: cell proliferation presumably takes place around 2 h after the beginning of the night (data point 2) at the cost of intracellular starch and metabolism seems to stop after 6 h (data point 4).

Very distinct observations can be made when N is added to the reactor at the beginning of the night phase (data point 1 in Fig. 3-4 C). Intracellular storage components are reduced by about 50.0 % whereas protein content rises by about 34.8 %. Until data point 3, protein synthesis clearly takes place at the cost of carbohydrate degradation, which

is in line with literature, i.e. that starch serves as a short-term energy buffer in microalgae cells (León-Saiki et al., 2017). Energy supply due to the reduction of lipids seems to serve long-term metabolic activities. N consumption is clearly visible as the N concentration in the reactor outflow was reduced by ~40.7 %. Nutrient uptake goes hand in hand with an increase in ABM from ~2.4 g·L<sup>-1</sup> to a maximum of ~3.9 g·L<sup>-1</sup> during the first 6 h of darkness. Enhanced nutrient uptake during the absence of light is thus possible presupposed that an intracellular energy buffer in the form of starch and/or lipids is available. Nevertheless,



**Fig. 3-5.** Specific photon absorption rate  $r_{Ph,abs,DBM}$  and DBM concentration ( $c_{DBM}$ ) of *Chlorella vulgaris* cells at continuous cultivation at  $350 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  for  $D = 0.0\text{--}1.0 \text{ d}^{-1}$  in  $0.1 \text{ d}^{-1}$ -steps.

metabolic activities seem to pause after 6 h of darkness, which is in line with the previous findings.

### 3.5. Evaluation of nutrient uptake performance during generic 24/7 WWT

Based on the data presented in this publication, a strategy for a virtual 24-h continuous WWT process using *Chlorella vulgaris* is outlined. At this point, we aimed to demonstrate how the storage potential of microalgae can be exploited to allow nutrient uptake even under unfavourable conditions concerning light availability.

Therefore, specific photon uptake of DBM ( $r_{Ph,abs,DBM}$ ) was calculated as function of  $D$  from the data discussed in Section 3.1.  $r_{Ph,abs,DBM}$  can be divided into three sections corresponding to low, middle, and high dilution rates (Fig. 3-5). For  $D = 0.0\text{--}0.2\text{ d}^{-1}$ , the maximum quota of intracellular storage components due to nutrient limitations is reached limiting the number of absorbed photons per cell to  $\sim 5\ \mu\text{mol}_{Ph}$  per  $\text{g}_{DBM}$  and per second. A linear increase in  $r_{Ph,abs,DBM}$  is measured with rising  $D$  for  $D = 0.3\text{--}0.6\text{ d}^{-1}$ , marking the window of operation for a virtual 24-h continuous WWT scenario: within this area, no residual N and P could be detected (or below limits of discharge). Furthermore, the linearity means a doubling in  $c_{DBM}$  at duplicated light intensity.

The photobioreactor system suggested for the scenario is a raceway pond due to its low investment costs, easy installation, economic operation, and scalability (Han Ting et al., 2017). Light penetration into the raceway pond is assumed to be ideal, the correlation between illumination and light availability is supposed to be identical to the experiments. A constant hydraulic retention time is imposed by applying a constant dilution rate of  $D = 0.5\text{ d}^{-1}$ . The dilution rate was chosen as the linear relationship between specific photon absorption and growth rate (discussed above) revealed by the data presented. In a real-case scenario, a variation of the dilution rate depending on weather conditions and nutrient load of the WW is imaginable, e.g. by installing a buffer pond. An external membrane filtration unit is assumed to be installed to the raceway pond (Ortiz Tena et al., 2021), resulting in a so-called

membrane photobioreactor (MPBR). The pond outflow can thus be separated into the clean effluent and highly concentrated biomass, enabling constant harvesting for valorisation or alternatively the storage of surplus biomass externally for the night or periods with low light intensities. Furthermore, the MPBR allows a separation of solids retention time (SRT) and hydraulic retention time (HRT) according to the WWT process needs. In addition to the constant hydraulic retention time during all four periods, constant biomass is targeted all the time to reduce dynamic effects. This is possible by regulated harvesting or cell retention activity. The 24-h day is separated into four periods (daily periods), each lasting for 6 h with a constant light intensity: morning ( $I_1 = 350\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), noon ( $I_2 = 700\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), evening ( $I_3 = 350\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), and night ( $I_4 = 0\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Even though light intensities in-/decrease abruptly between each period and thus do not reflect the real, smooth progressions during a day, a statement regarding the feasibility of the 24-h process will be possible. The nutrient load of the proposed WW is set to  $c_{NH_4,0} = 243\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $\sim 14\ \text{mmol}_N\cdot\text{L}^{-1}$ ) and is thus at the upper range of most municipal and industrial WWs (Monfet and Unc, 2017). During each period, a total of  $25\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  of nitrogen needs to be removed allowing the synthesis of a maximum of  $1676\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ABM (assuming  $q_{N,ABM} = 11.94\%$ ) – independent of light availability. Due to the capacity of building-up storage components (starch + lipids), DBM concentrations can exceed ABM at the chosen light availabilities. For the morning and evening periods, no adaption of the DBM concentration is aimed. During the noon period, a constant DBM concentration of  $\sim 2\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  is directed. During night, no separation of biomass occurs. Cells are furthermore supplied from the external storage depending on the process needs. The amount of ABM in each period varies according to the different light availabilities. The transition of macromolecular composition between daily periods is not considered; only steady-state values were used for calculations as natural light conditions do not change abruptly. A process scheme for the described process is drawn in Fig. 3-6.

Starting the day of the 24-h WWT scenario, the light intensity allows for a  $c_{DBM}$  of  $\sim 2.4\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  at full nutrient uptake. Doubled light intensity

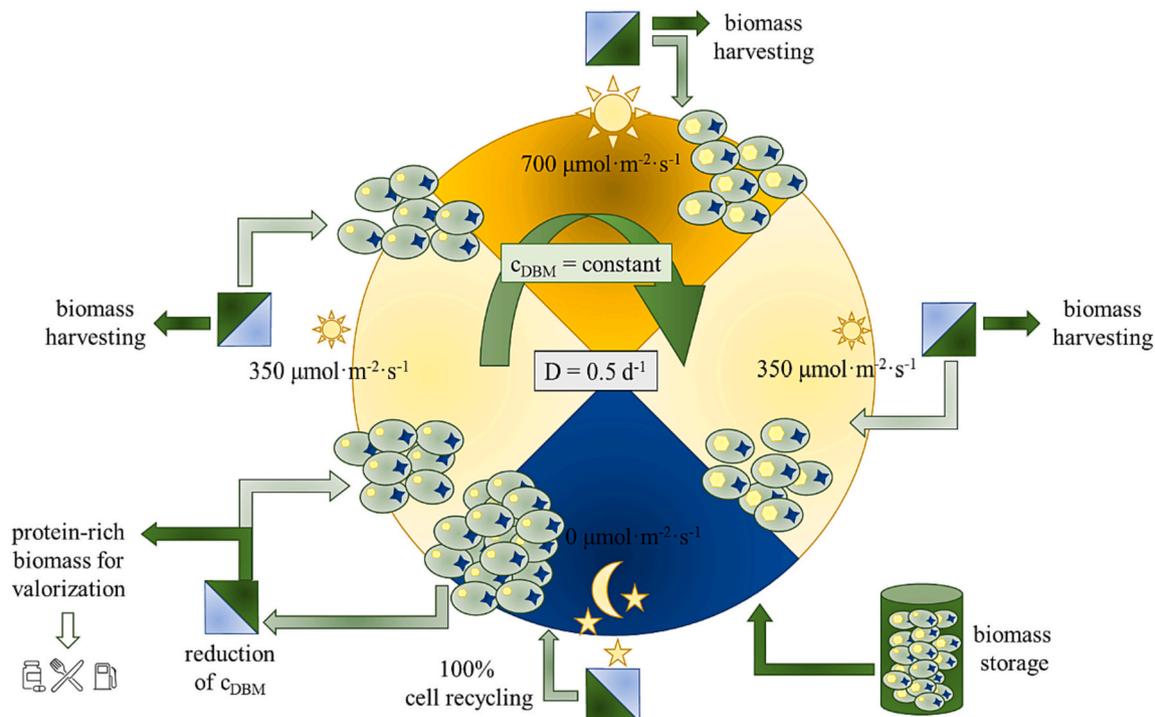


Fig. 3-6. Theoretical 24-h wastewater treatment process scheme using microalgae *Chlorella vulgaris* at a dilution rate of  $0.5\text{ d}^{-1}$ . During the morning and evening periods, light intensities are set to  $350\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , during noon, they were doubled to  $700\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Biomass from daylight periods needs to be stored externally to enable full nutrient uptake during the night. At the end of the night, protein-rich biomass can be further valorised.

at noon doesn't influence  $c_{ABM}$  but would allow an increase of  $c_{DBM}$  to  $\sim 4.7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  due to the increased number of photons that can be converted to storage components at complete nutrient uptake. As  $c_{DBM}$  is reduced by filtration and biomass removal to  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , surplus cells are stored in the external tank. Skimming the biomass reduces  $c_{ABM}$  to  $\sim 0.75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , however complete nutrient uptake is still feasible as nitrogen is fixed within the separated cells. As culture conditions (light and nitrogen availability) of evening and morning periods are similar, the proposed scenario is the same, including full nutrient uptake at  $DBM \sim 2.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Based on the N spiking experiment, a specific ammonium uptake rate during the night of  $6.25 \text{ mg}_{\text{NH}_4}\cdot\text{mg}_{\text{DBM}}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  could be calculated. Furthermore, a specific yield for the  $\text{NH}_4^+$  uptake at the cost of intracellular starch was quantified to 0.19, revealing a minimum biomass demand during the night of  $\sim 1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  of DBM. The measured ammonium removal rate during the night of  $\sim 6.25 \text{ mg}_{\text{NH}_4}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  is thus higher than the theoretically required rate of  $5.06 \text{ mg}_{\text{NH}_4}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . The DBM needs to be characterised with a minimum carbohydrate content of 27 %, which is the case at noon ( $q_{\text{Carb}} = 62.5 \%$ ) as well as during the morning and evening periods ( $q_{\text{Carb}} = 30.2 \%$ ). Cell storage from the daylight periods thus allows full nutrient uptake during the night. At the end of the night, a protein-rich microalgae biomass is available for further valorisation.

In addition to the chosen light intensities of 350 and  $700 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , we considered two scenarios with reduced light availability of (i) 50 % and (ii) 80 % of the morning intensity in order to consider cloudy days. The available values for global horizontal irradiation are reduced inside the microalgal suspension to yield the lower values chosen as average values in the volume. Light limitation at scenario (i) causes a reduction in ABM to  $\sim 1.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  leading to insufficient nutrient uptake from the WW. Furthermore, DBM is reduced to  $\sim 1.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  as synthesis of storage components is hardly possible. The photon energy available does not allow to fully metabolise all N available. Cell recycling is named as a promising tool to enhance nutrient uptake in photobioreactor systems (Marbelia et al., 2014). Returning biomass at low light intensities (increase of SRT of 50 %) in fact rises both, DBM ( $\sim 2.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and ABM ( $\sim 2.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) at a slightly enhanced but not full nutrient uptake. Cell recycling further decreases in photon availability per cell and thus reduces the amount of storage components synthesised. This is a major drawback of the MPBR technology for WWT as the removal of nutrients from the WW is directly connected to biomass proliferation as N and P are integrated into cellular compounds, such as proteins. The process of cell division of course requires energy or rather photon supply restricting the WW remediation at days with low light intensities. Nevertheless, cell recycling is a very useful tool to ensure complete usage of all photons available. For scenario (ii), an increase in SRT of 20 % leads to ABM and DBM concentrations of  $1.8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  and  $2.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively, enabling complete N uptake. The light energy provided marks the transition point for the chosen process, at which photon availability is just high enough to treat the WW.

#### 4. Conclusion

Continuous cultivation of the microalgae *Chlorella vulgaris* at  $D = 0.0\text{--}1.0\text{d}^{-1}$  in  $0.1 \text{ d}^{-1}$ -steps revealed a constant nitrogen (11,94%<sub>ABM</sub>) and protein quota (65–68%<sub>ABM</sub>) when storage components (starch + lipids) are excluded applying the concept of ABM. Metabolic activities during the dark period include the conversion of starch into lipids at nitrogen limitation. At high nitrogen supply, protein synthesis occurs at the cost of intracellular storage components at the simultaneous increase of ABM during the night. Nitrogen uptake during the night is clearly visible, presupposed that an intracellular energy storage (carbohydrates and/or lipids) is available. Adapting the biomass concentration inside a PBR changes specific availabilities of nutrients (N and P) and light, influencing the microalgal macromolecular composition, which is a valuable tool for optimal WWT reacting to varying N and P

concentrations and changing light availabilities. Continuous 24-h WWT is possible applying cell recycling and storage of carbohydrate-rich biomass, producing valuable protein-rich biomass at the end of the night.

#### CRedit authorship contribution statement

**Franziska Ortiz Tena:** Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Methodology, Visualization, Writing – original draft. **Victoria Bickel:** Investigation, Validation, Writing – review & editing. **Christian Steinweg:** Investigation, Writing – review & editing. **Clemens Posten:** Conceptualization, Methodology, Project administration, Supervision, Validation, Writing – original draft.

#### Declaration of competing interest

The authors have declared no conflicts of interest.

#### Data availability

The data that has been used is confidential.

#### Acknowledgements

This work was supported by the AnMBRA (Anaerobic Membrane BioReactor and Algae production for Industrial Wastewater Recycling) project (WT1605/02WIL1455A, 02WIL 1455B, 01/07/2017 to 31/12/2021). The AnMBRA project was funded by the German-Israeli Water Technology Cooperation between the Israeli Ministry of Science and Technology and German Federal Ministry of Education and Research.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.169082>.

#### References

- Ågren, G.I., 2004. The C N P stoichiometry of autotrophs - theory and observations. *Ecol. Lett.* 7 (3), 185–191. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00567.x>.
- Arora, N., Patel, A., Pruthi, P.A., Pruthi, V., 2016. Synergistic dynamics of nitrogen and phosphorus influences lipid productivity in *Chlorella minutissima* for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 213, 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.112>.
- Benvenuti, G., Bosma, R., Cuaresma, M., Janssen, M., Barbosa, M.J., Wijffels, R.H., 2015. Selecting microalgae with high lipid productivity and photosynthetic activity under nitrogen starvation. *J. Appl. Phycol.* 27 (4), 1425–1431. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0470-8>.
- Berman-Frank, I., Dubinsky, Z., 1999. Balanced growth in aquatic plants: myth or reality? Phytoplankton use the imbalance between carbon assimilation and biomass production to their strategic advantage. *BioScience* 49 (1), 29–37. <https://academic.oup.com/bioscience/article/49/1/29/292266>.
- Bernard, O., 2011. Hurdles and challenges for modelling and control of microalgae for CO2 mitigation and biofuel production. *J. Process Control* 21 (10), 1378–1389. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959152411001533>.
- Beuckels, A., Smolders, E., Muylaert, K., 2015. Nitrogen availability influences phosphorus removal in microalgae-based wastewater treatment. *Water Res.* 77, 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.03.018>.
- Brányiková, I., Marsálková, B., Doucha, J., Brányik, T., Bišová, K., Zachleder, V., et al., 2011. Microalgae—novel highly efficient starch producers. *Biotechnol. Bioeng.* 108 (4), 766–776. <https://doi.org/10.1002/bit.23016>.
- Breuer, G., de Jaeger, L., Artus, V.P.G., Martens, D.E., Springer, J., Draaisma, R.B., et al., 2014. Superior triacylglycerol (TAG) accumulation in starchless mutants of *Scenedesmus obliquus*: (II) evaluation of TAG yield and productivity in controlled photobioreactors. *Biotechnol. Biofuels* 7, 70. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-70>.
- Burnap, R.L., 2015. Systems and photosystems: cellular limits of autotrophic productivity in cyanobacteria. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 3, 1. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25654078/>.
- Bux, F., Chisti, Y. (Eds.), 2016. *Algae Biotechnology: Products and Processes, 1st ed.* Springer, Switzerland.
- Cha, T.S., Yee, W., Phua, P.S.P., Loh, S.H., Aziz, A., 2021. A brief period of darkness induces changes in fatty acid biosynthesis towards accumulation of saturated fatty

- acids in *Chlorella vulgaris* UMT-M1 at stationary growth phase. *Biotechnol. Lett.* 43 (4), 803–812. <https://doi.org/10.1007/s10529-021-03077-2>.
- Chai, W.S., Tan, W.G., Halimatul Munawaroh, H.S., Gupta, V.K., Ho, S.-H., Show, P.L., 2021. Multifaceted roles of microalgae in the application of wastewater biotreatment: a review. *Environ. Pollut. (Barking, Essex 1987)* 269, 116236. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116236>.
- Christenson, L., Sims, R., 2011. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnol. Adv.* 29 (6), 686–702. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.015>.
- Cronje, G.L., Beeharry, A.O., Wentzel, M.C., Ekama, G.A., 2002. Active biomass in activated sludge mixed liquor. *Water Res.* 36 (2), 439–444. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135401002263>.
- Dickinson, K.E., Whitney, C.G., McGinn, P.J., 2013. Nutrient remediation rates in municipal wastewater and their effect on biochemical composition of the microalga *Scenedesmus* sp. *AMDD. Algal Res.* 2 (2), 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.01.009>.
- Dillschneider, R., Steinweg, C., Rosello-Sastre, R., Posten, C., 2013. Biofuels from microalgae: photoconversion efficiency during lipid accumulation. *Bioresour. Technol.* 142, 647–654. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.088>.
- Doucha, J., Lřivanský, K., 1995. Novel outdoor thin-layer high density microalgal culture system: productivity and operational parameters. *Algol. Stud.* 76, 129–147. <https://doi.org/10.1127/algol.stud/76/1995/129>.
- Edmundson, S.J., Huesemann, M.H., 2015. The dark side of algae cultivation: characterizing night biomass loss in three photosynthetic algae, *Chlorella sorokiniana*, *Nannochloropsis salina* and *Picochlorum* sp. *Algal Res.* 12, 470–476. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211926415300862>.
- Franks, D.T., Sabella, T.J., Henley, W.J., 2022. Minimum nitrogen cell quota for maximal growth rate in cycloturbidostat cultures of *Picochlorum* oklahomense. *Algal Res.* 67, 102818. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211926422001898>.
- Geider, R., La Roche, J., 2002. Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. *Eur. J. Phycol.* 37 (1), 1–17. <https://doi.org/10.1017/S0967026201003456>.
- German Environment Agency (UBA), 2018. *Water Resource Management in Germany: Fundamentals, Pressures, Measures*. Federal Ministry for the Environment, Nature Conservation and Nuclear Safety, Dessau-Roßlau.
- Han Ting, Lu, Haifeng, Ma Shanshan, Zhang, Yuanhui, Zhidan, Liu, Na, Duan, 2017. Progress in microalgae cultivation photobioreactors and applications in wastewater treatment: a review. *Int. J. Agric. Biol. Eng.* 10 (1), 1–29. <https://ijabe.org/index.php/ijabe/article/view/2705>.
- Inomura, K., Omta, A.W., Talmy, D., Bragg, J., Deutsch, C., Follows, M.J., 2020. A mechanistic model of macromolecular allocation, elemental stoichiometry, and growth rate in phytoplankton. *Front. Microbiol.* 11, 86. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00086>.
- Jacobi, A., Steinweg, C., Sastre, R.R., Posten, C., 2012. Advanced photobioreactor LED illumination system: scale-down approach to study microalgal growth kinetics. *Eng. Life Sci.* 12 (6), 621–630. <https://doi.org/10.1002/elsc.201200004>.
- Janssen, J.H., Kastenhofer, J., de Hoop, J.A., Lamers, P.P., Wijffels, R.H., Barbosa, M.J., 2018. Effect of nitrogen addition on lipid productivity of nitrogen starved *Nannochloropsis gaditana*. *Algal Res.* 33, 125–132. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221192641731086X>.
- Jover, L.F., Effler, T.C., Buchan, A., Wilhelm, S.W., Weitz, J.S., 2014. The elemental composition of virus particles: implications for marine biogeochemical cycles. *Nat. Rev. Microbiol.* 12 (7), 519–528. <https://www.nature.com/articles/nrmicro3289>.
- Kato, Y., Fujihara, Y., Vavricka, C.J., Chang, J.-S., Hasunuma, T., Kondo, A., 2019. Light/dark cycling causes delayed lipid accumulation and increased photoperiod-based biomass yield by altering metabolic flux in oleaginous *Chlamydomonas* sp. *Biotechnol.* 12, 39. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1380-4>.
- León-Saiki, G.M., Remmers, I.M., Martens, D.E., Lamers, P.P., Wijffels, R.H., van der Veen, D., 2017. The role of starch as transient energy buffer in synchronized microalgal growth in *Acutodesmus obliquus*. *Algal Res.* 25, 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.05.018>.
- Li, K., Liu, Q., Fang, F., Luo, R., Lu, Q., Zhou, W., et al., 2019. Microalgae-based wastewater treatment for nutrients recovery: a review. *Bioresour. Technol.* 291, 121934. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121934>.
- Lu, Y., Gehan, J.P., Sharkey, T.D., 2005. Daylength and circadian effects on starch degradation and maltose metabolism. *Plant Physiol.* 138 (4), 2280–2291. <https://doi.org/10.1104/pp.105.061903>.
- Luo, Y., Le-Clech, P., Henderson, R.K., 2017. Simultaneous microalgae cultivation and wastewater treatment in submerged membrane photobioreactors: a review. *Algal Res.* 24, 425–437. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.10.026>.
- Marbelia, L., Bilad, M.R., Passaris, I., Discart, V., Vandamme, D., Beuckels, A., et al., 2014. Membrane photobioreactors for integrated microalgae cultivation and nutrient remediation of membrane bioreactors effluent. *Bioresour. Technol.* 163, 228–235. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.012>.
- Mat Aron, N.S., Khoo, K.S., Chew, K.W., Veeramuthu, A., Chang, J.-S., Show, P.L., 2021. Microalgae cultivation in wastewater and potential processing strategies using solvent and membrane separation technologies. *J. Water Process Eng.* 39, 101701. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101701>.
- Monfret, E., Unc, A., 2017. Defining wastewaters used for cultivation of algae. *Algal Res.* 24, 520–526. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.12.008>.
- Ogbonna, J.C., Tanaka, H., 1996. Night biomass loss and changes in biochemical composition of cells during light/dark cyclic culture of *Chlorella pyrenoidosa*. *J. Ferment. Bioeng.* 82 (6), 558–564. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0922338X97812524>.
- Ortiz Tena, F., Ranglová, K., Kubač, D., Steinweg, C., Thomson, C., Masojidek, J., et al., 2021. Characterization of an aerated submerged hollow fiber ultrafiltration device for efficient microalgae harvesting. *Eng. Life Sci.* 21 (10), 607–622. <https://doi.org/10.1002/elsc.202100052>.
- Oswald, W.J., Gotaas, H.B., Golueke, C.G., Kellen, W.R., Gloyna, E.F., Hermann, E.R., 1957. Algae in waste treatment [with discussion]. *Sewage Ind. Waste.* 29 (4), 437–457. <http://www.jstor.org/stable/25033322>.
- Powell, N., Shilton, A., Chisti, Y., Pratt, S., 2009. Towards a luxury uptake process via microalgae—defining the polyphosphate dynamics. *Water Res.* 43 (17), 4207–4213. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.06.011>.
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y., Vaca-Garcia, C., 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: a review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 35, 265–278. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>.
- Samorì, G., Samorì, C., Pistocchi, R., 2014. Nutrient removal efficiency and physiological responses of *Desmodesmus communis* at different HRTs and nutrient stress condition using different sources of urban wastewater effluents. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 173 (1), 74–89. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0792-7>.
- Schediwy, K., Trautmann, A., Steinweg, C., Posten, C., 2019. Microalgal kinetics - a guideline for photobioreactor design and process development. *Eng. Life Sci.* 19 (12), 830–843. <https://doi.org/10.1002/elsc.201900107>.
- Sforza, E., Calvaruso, C., La Rocca, N., Bertuccio, A., 2018. Luxury uptake of phosphorus in *Nannochloropsis salina*: effect of P concentration and light on P uptake in batch and continuous cultures. *Biochem. Eng. J.* 134, 69–79. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X18300913>.
- Shoener, B.D., Schramm, S.M., Béline, F., Bernard, O., Martínez, C., Plósz, B.G., et al., 2019. Microalgae and cyanobacteria modeling in water resource recovery facilities: a critical review. *Water Res.* X 2, 100024. <https://doi.org/10.1016/j.wroa.2018.100024>.
- Solovchenko, A., Khozin-Goldberg, I., Selyakh, I., Semenova, L., Ismagulova, T., Lukyanov, A., et al., 2019. Phosphorus starvation and luxury uptake in green microalgae revisited. *Algal Res.* 43, 101651. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101651>.
- Su, Y., 2021. Revisiting carbon, nitrogen, and phosphorus metabolisms in microalgae for wastewater treatment. *Sci. Total Environ.* 762, 144590. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144590>.
- Torzillo, G., Sacchi, A., Materassi, R., Richmond, A., 1991. Effect of temperature on yield and night biomass loss in *Spirulina platensis* grown outdoors in tubular photobioreactors. *J. Appl. Phycol.* 3 (2), 103–109. <https://doi.org/10.1007/BF00003691>.
- Wellburn, A.R., 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as Total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* 144 (3), 307–313. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0176161711811922>.
- Xin, L., Hu, H.-Y., Ke, G., Sun, Y., 2010. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresour. Technol.* 101 (14), 5494–5500. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.016>.
- Yemm, E.W., Willis, A.J., 1954. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochem. J.* 57 (3), 508–514. <https://doi.org/10.1042/bj0570508>.
- Zhang, M., Yao, L., Maleki, E., Liao, B.-Q., Lin, H., 2019. Membrane technologies for microalgal cultivation and dewatering: recent progress and challenges. *Algal Res.* 44, 101686. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101686>.
- Zhu, S., Huang, W., Xu, J., Wang, Z., Xu, J., Yuan, Z., 2014. Metabolic changes of starch and lipid triggered by nitrogen starvation in the microalga *Chlorella zofingiensis*. *Bioresour. Technol.* 152, 292–298. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.092>.

# Literaturverzeichnis

- Abdelfattah, Abdallah; Ali, Sameh Samir; Ramadan, Hassan; El-Aswar, Eslam Ibrahim; Eltabwab, Reham; Ho, Shih-Hsin et al. (2023): Microalgae-based wastewater treatment: Mechanisms, challenges, recent advances, and future prospects. In: *Environmental science and ecotechnology* 13, S. 100205. DOI: 10.1016/j.ese.2022.100205.
- Acién, F. G.; Fernández, J. M.; Magán, J. J.; Molina, E. (2012): Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. In: *Biotechnology Advances* 30 (6), S. 1344–1353. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2012.02.005.
- Acién Fernández, Francisco Gabriel; Gómez-Serrano, Cintia; Fernández-Sevilla, José María (2018): Recovery of Nutrients From Wastewaters Using Microalgae. In: *Front. Sustain. Food Syst.* 2, Artikel 59, S. 577. DOI: 10.3389/fsufs.2018.00059.
- Ågren, Göran I. (2004): The C : N : P stoichiometry of autotrophs - theory and observations. In: *Ecology Letters* 7 (3), S. 185–191. DOI: 10.1111/j.1461-0248.2004.00567.x.
- Åkerström, Anette M.; Mortensen, Leiv M.; Rusten, Bjørn; Gislerød, Hans Ragnar (2016): Biomass production and removal of ammonium and phosphate by *Chlorella* sp. in sludge liquor at natural light and different levels of temperature control. In: *SpringerPlus* 5 (1), S. 676. DOI: 10.1186/s40064-016-2266-6.
- Al hattab, Mariam (2015): Microalgae Harvesting Methods for Industrial Production of Biodiesel. Critical Review and Comparative Analysis. In: *J Fundam Renewable Energy Appl* 05 (02). DOI: 10.4172/2090-4541.1000154.
- Alam, Md. Asraful; Wang, Zhongming (2019): Microalgae Biotechnology for Development of Biofuel and Wastewater Treatment. Singapore: Springer Singapore.
- Alipourzadeh, Atefeh; Mehrnia, Mohammad Reza; Hallaj Sani, Ahmad; Babaei, Azadeh (2016): Application of response surface methodology for investigation of membrane fouling behaviours in microalgal membrane bioreactor: the effect of aeration rate and biomass concentration. In: *RSC Advances* 6 (112), S. 111182–111189. DOI: 10.1039/C6RA23188H.
- All-gas EU-Projekt (2023). Online verfügbar unter <https://www.all-gas.eu/>, zuletzt aktualisiert am 20.11.2023, zuletzt geprüft am 20.11.2023.
- Amaro, Helena M.; Salgado, Eva M.; Nunes, Olga C.; Pires, José C. M.; Esteves, Ana F. (2023): Microalgae systems - environmental agents for wastewater treatment and further potential biomass valorisation. In: *Journal of environmental management* 337, S. 117678. DOI: 10.1016/j.jenvman.2023.117678.
- Amini Khoeyi, Zahra; Seyfabadi, Jafar; Ramezanzpour, Zohreh (2012): Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris*. In: *Aquacult Int* 20 (1), S. 41–49. DOI: 10.1007/s10499-011-9440-1.
- Andersen, Robert A. (Hg.) (2009): Algal culturing techniques. Phycological Society of America. [Nachdr.]. Amsterdam, Heidelberg: Elsevier Academic Press.
- Azizi, Soroush; Bayat, Bahareh; Tayebati, Hanieh; Hashemi, Ali; Pajoum Shariati, Farshid (2020): Nitrate and phosphate removal from treated wastewater by *Chlorella vulgaris* under various light regimes within membrane flat plate photobioreactor. In: *Environ Prog Sustainable Energy*, S. 1. DOI: 10.1002/ep.13519.

- Bacchin P., Aimar P., Field R. W. (2006): Critical and sustainable fluxes: Theory, experiments and applications. In: *Journal of Membrane Science* 281 (1-2), S. 42–69. DOI: 10.1016/j.memsci.2006.04.014.
- Barros, Ana I.; Gonçalves, Ana L.; Simões, Manuel; Pires, José C.M. (2015): Harvesting techniques applied to microalgae: A review. In: *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 41, S. 1489–1500. DOI: 10.1016/j.rser.2014.09.037.
- Beardall, John; Burger-Wiersma, Tineke; Rijkeboer, Machteld; Sukenik, Assaf; Lemoalle, Jacques; Dubinsky, Zvy; Fontvielle, Daniel (1994): Studies on enhanced post-illumination respiration in microalgae. In: *J Plankton Res* 16 (10), S. 1401–1410. DOI: 10.1093/plankt/16.10.1401.
- Benvenuti, Giulia; Bosma, Rourke; Cuaresma, María; Janssen, Marcel; Barbosa, Maria J.; Wijffels, René H. (2015): Selecting microalgae with high lipid productivity and photosynthetic activity under nitrogen starvation. In: *J Appl Phycol* 27 (4), S. 1425–1431. DOI: 10.1007/s10811-014-0470-8.
- Bernard, Olivier; Mairet, Francis; Chachuat, Benoît (2016): Modelling of Microalgae Culture Systems with Applications to Control and Optimization. In: *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 153, S. 59–87. DOI: 10.1007/10\_2014\_287.
- Bernard, Olivier; Rémond, Barbara (2012): Validation of a simple model accounting for light and temperature effect on microalgal growth. In: *Bioresource Technology* 123, S. 520–527. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.07.022.
- Beuckels, Annelies; Smolders, Erik; Muylaert, Koenraad (2015): Nitrogen availability influences phosphorus removal in microalgae-based wastewater treatment. In: *Water research* 77, S. 98–106. DOI: 10.1016/j.watres.2015.03.018.
- Bhatia, Shashi Kant; Mehariya, Sanjeet; Bhatia, Ravi Kant; Kumar, Manu; Pugazhendhi, Arivalagan; Awasthi, Mukesh Kumar et al. (2021): Wastewater based microalgal biorefinery for bioenergy production: Progress and challenges. In: *The Science of the total environment* 751, S. 141599. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.141599.
- Bilad, M. R.; Arafat, Hassan A.; Vankelecom, Ivo F. J. (2014a): Membrane technology in microalgae cultivation and harvesting: a review. In: *Biotechnology Advances* 32 (7), S. 1283–1300. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2014.07.008.
- Bilad, M. R.; Discart, V.; Vandamme, D.; Foubert, I.; Muylaert, K.; Vankelecom, Ivo F. J. (2014b): Coupled cultivation and pre-harvesting of microalgae in a membrane photobioreactor (MPBR). In: *Bioresource Technology* 155, S. 410–417. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.05.026.
- Bischoff, H. W. & Bold, H. C. (1963): Phycological Studies IV. Some Soil Algae from Enchanted Rock and Related Algal Species. In: *University of Texas Publication* (6318).
- BLACKMAN, F. F. (1905): Optima and Limiting Factors. In: *Ann Bot os-19* (2), S. 281–296. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aob.a089000.
- Blanken, Ward; Postma, P. Richard; Winter, Lenneke de; Wijffels, René H.; Janssen, Marcel (2016): Predicting microalgae growth. In: *Algal Research* 14, S. 28–38. DOI: 10.1016/j.algal.2015.12.020.
- BOLTON, JAMES R.; HALL, DAVID O. (1991): THE MAXIMUM EFFICIENCY OF PHOTOSYNTHESIS \*. In: *Photochem Photobiol* 53 (4), S. 545–548. DOI: 10.1111/j.1751-1097.1991.tb03668.x.

- Boonchai, R.; Seo, G. (2015): Microalgae membrane photobioreactor for further removal of nitrogen and phosphorus from secondary sewage effluent. In: *Korean Journal of Chemical Engineering* 32 (10), S. 2047–2052. DOI: 10.1007/s11814-015-0043-9.
- Borowitzka, Michael A.; Beardall, John; Raven, John A. (2016): *The Physiology of Microalgae*. Cham: Springer International Publishing.
- Bourcier, D.; Féraud, J. P.; Colson, D.; Mandrick, K.; Ode, D.; Brackx, E.; Puel, F. (2016): Influence of particle size and shape properties on cake resistance and compressibility during pressure filtration. In: *Chemical Engineering Science* 144, S. 176–187. DOI: 10.1016/j.ces.2016.01.023.
- Breuer, Guido; Jaeger, Lenny de; Artus, Valentin P. G.; Martens, Dirk E.; Springer, Jan; Draaisma, René B. et al. (2014): Superior triacylglycerol (TAG) accumulation in starchless mutants of *Scenedesmus obliquus*: (II) evaluation of TAG yield and productivity in controlled photobioreactors. In: *Biotechnology for biofuels* 7, S. 70. DOI: 10.1186/1754-6834-7-70.
- Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und nukleare Sicherheit (2023a): Abwasser. Online verfügbar unter <https://www.bmu.de/themen/wasser-und-binnengewasser/abwasser>, zuletzt aktualisiert am 21.11.2023, zuletzt geprüft am 21.11.2023.
- Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und nukleare Sicherheit (2023b): Statistik Abwasserentsorgung- BMUV - Download. Online verfügbar unter <https://www.bmu.de/download/statistik-abwasserentsorgung>, zuletzt aktualisiert am 23.11.2023, zuletzt geprüft am 23.11.2023.
- Bux, Faizal; Chisti, Yusuf (Hg.) (2016): *Algae Biotechnology. Products and Processes*. 1st ed. 2016. Switzerland: Springer (Green Energy and Technology). Online verfügbar unter <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&AN=1174985>.
- Carr, N. G.; Mann, N. (1975): Nucleic acid synthesis and regulation in blue-green algae. In: *Biochemical Society transactions* 3 (3), S. 368–373. DOI: 10.1042/bst0030368.
- Castaing, J. B.; Massé, A.; Séchet, V.; Sabiri, N.-E.; Pontié, M.; Haure, J.; Jaouen, P. (2011): Immersed hollow fibres microfiltration (MF) for removing undesirable micro-algae and protecting semi-closed aquaculture basins. In: *Desalination* 276 (1-3), S. 386–396. DOI: 10.1016/j.desal.2011.03.081.
- Cha, Thye San; Yee, Willy; Phua, Pamela Szu Pin; Loh, Saw Hong; Aziz, Ahmad (2021): A brief period of darkness induces changes in fatty acid biosynthesis towards accumulation of saturated fatty acids in *Chlorella vulgaris* UMT-M1 at stationary growth phase. In: *Biotechnology letters* 43 (4), S. 803–812. DOI: 10.1007/s10529-021-03077-2.
- Chai, Wai Siong; Tan, Wee Gee; Halimatul Munawaroh, Heli Siti; Gupta, Vijai Kumar; Ho, Shih-Hsin; Show, Pau Loke (2021): Multifaceted roles of microalgae in the application of wastewater biotreatment: A review. In: *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* 269, S. 116236. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.116236.
- Chang, Yin-Ru; Lee, Duu-Jong (2012): Coagulation–Membrane Filtration of *Chlorella vulgaris* at Different Growth Phases. In: *Drying Technology* 30 (11-12), S. 1317–1322. DOI: 10.1080/07373937.2012.662710.
- Chen, Hui; Wang, Qiang (2020): Microalgae-based nitrogen bioremediation. In: *Algal Research* 46, S. 101775. DOI: 10.1016/j.algal.2019.101775.

- Cheng, Tuoyuan; Wei, Chun-Hai; Leiknes, TorOve (2017): Polishing of anaerobic secondary effluent by *Chlorella vulgaris* under low light intensity. In: *Bioresource Technology* 241, S. 360–368. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.05.149.
- Christenson, Logan; Sims, Ronald (2011): Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. In: *Biotechnology Advances* 29 (6), S. 686–702. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.05.015.
- Chu, Huaqiang; Zhao, Fangchao; Tan, Xiaobo; Yang, Libin; Zhou, Xuefei; Zhao, Jianfu; Zhang, Yalei (2016): The impact of temperature on membrane fouling in algae harvesting. In: *Algal Research* 16, S. 458–464. DOI: 10.1016/j.algal.2016.04.012.
- Coronado-Reyes, Jesús Alberto; SALAZAR-TORRES, Juan Alfonso; JUÁREZ-CAMPOS, Beatriz; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, Juan Carlos (2022): *Chlorella vulgaris*, a microalgae important to be used in Biotechnology: a review. In: *Food Sci. Technol* 42, Artikel e37320, e37320. DOI: 10.1590/fst.37320.
- De-Luca, Riccardo; Bernardi, Andrea; Meneghesso, Andrea; Morosinotto, Tomas; Bezzo, Fabrizio (2018): Modelling the photosynthetic electron transport chain in *Nannochloropsis gaditana* via exploitation of absorbance data. In: *Algal Research* 33, S. 430–439. DOI: 10.1016/j.algal.2018.06.016.
- Demirer, Goksel N.; Uludag-Demirer, Sibel (Hg.) (2022): Integrated wastewater management and valorization using algal cultures. Amsterdam, Kidlington, Oxford, Cambridge, MA: Elsevier. Online verfügbar unter <https://www.sciencedirect.com/science/book/9780323858595>.
- Dickinson, Kathryn E.; Whitney, Crystal G.; McGinn, Patrick J. (2013): Nutrient remediation rates in municipal wastewater and their effect on biochemical composition of the microalga *Scenedesmus* sp. AMDD. In: *Algal Research* 2 (2), S. 127–134. DOI: 10.1016/j.algal.2013.01.009.
- Diez, V.; Ezquerro, D.; Cabezas, J. L.; García, A.; Ramos, C. (2014): A modified method for evaluation of critical flux, fouling rate and in situ determination of resistance and compressibility in MBR under different fouling conditions. In: *Journal of Membrane Science* 453, S. 1–11. DOI: 10.1016/j.memsci.2013.10.055.
- Discart, V.; Bilad, M. R.; Marbelia, L.; Vankelecom, I. F. J. (2014): Impact of changes in broth composition on *Chlorella vulgaris* cultivation in a membrane photobioreactor (MPBR) with permeate recycle. In: *Bioresource Technology* 152, S. 321–328. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.11.019.
- Doucha, Jiri; Lívanský, Karel (1995): Novel outdoor thin-layer high density microalgal culture system: Productivity and operational parameters. In: *Algological Studies* 76, S. 129–147. DOI: 10.1127/algol\_stud/76/1995/129.
- Doucha, Jiří; Lívanský, K. (2012): Production of high-density *Chlorella* culture grown in fermenters. In: *J Appl Phycol* 24 (1), S. 35–43. DOI: 10.1007/s10811-010-9643-2.
- Drews, Anja (2010): Membrane fouling in membrane bioreactors—Characterisation, contradictions, cause and cures. In: *Journal of Membrane Science* 363 (1-2), S. 1–28. DOI: 10.1016/j.memsci.2010.06.046.
- Drexler, Ivy L. C.; Yeh, Daniel H. (2014): Membrane applications for microalgae cultivation and harvesting: a review. In: *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 13 (4), S. 487–504. DOI: 10.1007/s11157-014-9350-6.

- Edmundson, Scott J.; Huesemann, Michael H. (2015): The dark side of algae cultivation: Characterizing night biomass loss in three photosynthetic algae, *Chlorella sorokiniana*, *Nannochloropsis salina* and *Picochlorum* sp. In: *Algal Research* 12, S. 470–476. DOI: 10.1016/j.algal.2015.10.012.
- Experimental Phycology and Culture Collection of Algae at the University of Goettingen (EP-SAG) (2023): SAG 211-12 *Chlorella vulgaris*. Online verfügbar unter [http://sagdb.uni-goettingen.de/detailedList.php?str\\_number=211-12](http://sagdb.uni-goettingen.de/detailedList.php?str_number=211-12), zuletzt aktualisiert am 24.04.2023, zuletzt geprüft am 24.04.2023.
- Fasaei, F.; Bitter, J. H.; Slegers, P. M.; van Boxtel, A.J.B. (2018): Techno-economic evaluation of microalgae harvesting and dewatering systems. In: *Algal Research* 31, S. 347–362. DOI: 10.1016/j.algal.2017.11.038.
- Field, R. W.; Wu, D.; Howell, J. A.; Gupta, B. B. (1995): Critical flux concept for microfiltration fouling. In: *Journal of Membrane Science* 100 (3), S. 259–272. DOI: 10.1016/0376-7388(94)00265-Z.
- Fortunato, Luca; Lamprea, Andrés Felipe; Leiknes, TorOve (2020): Evaluation of membrane fouling mitigation strategies in an algal membrane photobioreactor (AMPBR) treating secondary wastewater effluent. In: *The Science of the total environment* 708, S. 134548. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.134548.
- Franks, Dylan T.; Sabella, Tony J.; Henley, William J. (2022): Minimum nitrogen cell quota for maximal growth rate in cycloturbidostat cultures of *Picochlorum oklahomense*. In: *Algal Research* 67, S. 102818. DOI: 10.1016/j.algal.2022.102818.
- Gao, Feng; Li, Chen; Yang, Zhao-Hui; Zeng, Guang-Ming; Feng, Li-Juan; Liu, Jun-zhi et al. (2016a): Continuous microalgae cultivation in aquaculture wastewater by a membrane photobioreactor for biomass production and nutrients removal. In: *Ecological Engineering* 92, S. 55–61. DOI: 10.1016/j.ecoleng.2016.03.046.
- Gao, Feng; Li, Chen; Yang, Zhao-Hui; Zeng, Guang-Ming; Mu, Jun; Liu, Mei; Cui, Wei (2016b): Removal of nutrients, organic matter, and metal from domestic secondary effluent through microalgae cultivation in a membrane photobioreactor. In: *J Chem Technol Biotechnol* 91 (10), S. 2713–2719. DOI: 10.1002/jctb.4879.
- García, Joan; Ortiz, Antonio; Álvarez, Eduardo; Belohlav, Vojtech; García-Galán, María Jesús; Díez-Montero, Rubén et al. (2018): Nutrient removal from agricultural run-off in demonstrative full scale tubular photobioreactors for microalgae growth. In: *Ecological Engineering* 120, S. 513–521. DOI: 10.1016/j.ecoleng.2018.07.002.
- Geider, Richard; La Roche, Julie (2002): Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. In: *European Journal of Phycology* 37 (1), S. 1–17. DOI: 10.1017/S0967026201003456.
- González-Camejo, J.; Aparicio, S.; Jiménez-Benítez, A.; Pachés, M.; Ruano, M. V.; Borrás, L. et al. (2020): Improving membrane photobioreactor performance by reducing light path: operating conditions and key performance indicators. In: *Water research* 172, S. 115518. DOI: 10.1016/j.watres.2020.115518.
- González-Camejo, J.; Jiménez-Benítez, A.; Ruano, M. V.; Robles, A.; Barat, R.; Ferrer, J. (2019): Optimising an outdoor membrane photobioreactor for tertiary sewage treatment. In: *Journal of environmental management* 245, S. 76–85. DOI: 10.1016/j.jenvman.2019.05.010.

- González-Camejo, Josué; Ferrer, José; Seco, Aurora; Barat, Ramón (2021): Outdoor microalgae-based urban wastewater treatment: Recent advances, applications, and future perspectives. In: *WIREs Water* 8 (3). DOI: 10.1002/wat2.1518.
- Gorman, D. S.; Levine, R. P. (1965): Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardi*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 54 (6), S. 1665–1669. DOI: 10.1073/pnas.54.6.1665.
- Goto, K.; Johnson, C. H. (1995): Is the cell division cycle gated by a circadian clock? The case of *Chlamydomonas reinhardtii*. In: *J Cell Biol* 129 (4), S. 1061–1069. DOI: 10.1083/jcb.129.4.1061.
- Grobbelaar, Johan U.; Soeder, Carl J. (1985): Respiration losses in planktonic green algae cultivated in raceway ponds. In: *J Plankton Res* 7 (4), S. 497–506. DOI: 10.1093/plankt/7.4.497.
- Grossman, Amit Dan; Belete, Yonas Zeslase; Boussiba, Sammy; Yogeve, Uri; Posten, Clemens; Ortiz Tena, Franziska et al. (2021): Advanced near-zero waste treatment of food processing wastewater with water, carbon, and nutrient recovery. In: *Science of the Total Environment* 779, S. 146373. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.146373.
- Gupta, Sanjay Kumar; Bux, Faizal (2019): Application of Microalgae in Wastewater Treatment. Cham: Springer International Publishing.
- Han, Feifei; Wang, Weiliang; Li, Yuanguang; Shen, Guomin; Wan, Minxi; Wang, Jun (2013): Changes of biomass, lipid content and fatty acids composition under a light-dark cyclic culture of *Chlorella pyrenoidosa* in response to different temperature. In: *Bioresource Technology* 132, S. 182–189. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.12.175.
- Han, Jichang; Thomsen, Laurenz; Pan, Kehou; Wang, Pu; Wawilow, Tatjana; Osundeko, Olu-mayowa et al. (2020): Treating wastewater by indigenous microalgae strain in pilot platform located inside a municipal wastewater treatment plant. In: *Environmental technology* 41 (25), S. 3261–3271. DOI: 10.1080/09593330.2019.1604816.
- Hom-Díaz, Andrea; Jaén-Gil, Adrián; Bello-Laserna, Iris; Rodríguez-Mozaz, Sara; Vicent, Teresa; Barceló, Damià; Blánquez, Paqui (2017): Performance of a microalgal photobioreactor treating toilet wastewater: Pharmaceutically active compound removal and biomass harvesting. In: *The Science of the total environment* 592, S. 1–11. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.02.224.
- Huisman, Ingmar H.; Dutré, Benoît; Persson, Kenneth M.; Trägårdh, Gun (1997): Water permeability in ultrafiltration and microfiltration: Viscous and electroviscous effects. In: *Desalination* 113 (1), S. 95–103. DOI: 10.1016/S0011-9164(97)00118-5.
- Hutner, S. H.; Provasoli, L.; Schatz, Albert; Haskins, C. P. (1950): Some Approaches to the Study of the Role of Metals in the Metabolism of Microorganisms. In: *Proceedings of the American Philosophical Society* 94 (2), S. 152–170. Online verfügbar unter <http://www.jstor.org/stable/3143215>.
- Inomura, Keisuke; Omta, Anne Willem; Talmy, David; Bragg, Jason; Deutsch, Curtis; Follows, Michael J. (2020): A Mechanistic Model of Macromolecular Allocation, Elemental Stoichiometry, and Growth Rate in Phytoplankton. In: *Frontiers in microbiology* 11, S. 86. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00086.
- InoWeb (2023): Research | Algatech. Online verfügbar unter <https://www.alga.cz/en/c-337-research.html>, zuletzt aktualisiert am 24.04.2023, zuletzt geprüft am 24.04.2023.

- Jacobi, Anna; Steinweg, Christian; Sastre, Rosa Rosello; Posten, Clemens (2012): Advanced photobioreactor LED illumination system: Scale-down approach to study microalgal growth kinetics. In: *Eng. Life Sci.* 12 (6), S. 621–630. DOI: 10.1002/elsc.201200004.
- Janssen, Jorijn H.; Kastenhofer, Jens; Hoop, Jacob A. de; Lamers, Packo P.; Wijffels, René H.; Barbosa, Maria J. (2018): Effect of nitrogen addition on lipid productivity of nitrogen starved *Nannochloropsis gaditana*. In: *Algal Research* 33, S. 125–132. DOI: 10.1016/j.algal.2018.05.009.
- Kanchanatip, Ekkachai; Su, Bo-Rung; Tulaphol, Sattrawut; Den, Walter; Grisdanurak, Nurak; Kuo, Chi-Chang (2016): Fouling characterization and control for harvesting microalgae *Arthrospira* (*Spirulina*) *maxima* using a submerged, disc-type ultrafiltration membrane. In: *Bioresource Technology* 209, S. 23–30. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.02.081.
- Kato, Yuichi; Fujihara, Yusuke; Vavricka, Christopher J.; Chang, Jo-Shu; Hasunuma, Tomohisa; Kondo, Akihiko (2019): Light/dark cycling causes delayed lipid accumulation and increased photoperiod-based biomass yield by altering metabolic flux in oleaginous *Chlamydomonas* sp. In: *Biotechnology for biofuels* 12, S. 39. DOI: 10.1186/s13068-019-1380-4.
- Kinnarinen, Teemu; Tuunila, Ritva; Häkkinen, Antti (2017): Reduction of the width of particle size distribution to improve pressure filtration properties of slurries. In: *Minerals Engineering* 102, S. 68–74. DOI: 10.1016/j.mineng.2016.12.009.
- Kliphuis, Anna M. J.; Klok, Anne J.; Martens, Dirk E.; Lamers, Packo P.; Janssen, Marcel; Wijffels, René H. (2012): Metabolic modeling of *Chlamydomonas reinhardtii*: energy requirements for photoautotrophic growth and maintenance. In: *J Appl Phycol* 24 (2), S. 253–266. DOI: 10.1007/s10811-011-9674-3.
- Le Clech, Pierre; Jefferson, Bruce; Chang, In Soung; Judd, Simon J. (2003): Critical flux determination by the flux-step method in a submerged membrane bioreactor. In: *Journal of Membrane Science* 227 (1-2), S. 81–93. DOI: 10.1016/j.memsci.2003.07.021.
- Le-Clech, Pierre; Chen, Vicki; Fane, Tony A.G. (2006): Fouling in membrane bioreactors used in wastewater treatment. In: *Journal of Membrane Science* 284 (1-2), S. 17–53. DOI: 10.1016/j.memsci.2006.08.019.
- Legrand, Jack; Artu, Arnaud; Pruvost, Jérémy (2021): A review on photobioreactor design and modelling for microalgae production. In: *React. Chem. Eng.* 6 (7), S. 1134–1151. DOI: 10.1039/D0RE00450B.
- León-Saiki, G. Mitsue; Remmers, Ilse M.; Martens, Dirk E.; Lamers, Packo P.; Wijffels, René H.; van der Veen, Douwe (2017): The role of starch as transient energy buffer in synchronized microalgal growth in *Acutodesmus obliquus*. In: *Algal Research* 25, S. 160–167. DOI: 10.1016/j.algal.2017.05.018.
- Lew, B.; Tarre, S.; Beliavski, M.; Dosoretz, C.; Green, M. (2009): Anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) for domestic wastewater treatment. In: *Desalination* 243 (1-3), S. 251–257. DOI: 10.1016/j.desal.2008.04.027.
- Li, Kun; Liu, Qiang; Fang, Fan; Luo, Ruihuan; Lu, Qian; Zhou, Wenguang et al. (2019): Microalgae-based wastewater treatment for nutrients recovery: A review. In: *Bioresource Technology* 291, S. 121934. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.121934.
- Li, Tao; Xu, Jin; Gao, Baoyan; Xiang, Wenzhou; Li, Aifen; Zhang, Chengwu (2016): Morphology, growth, biochemical composition and photosynthetic performance of *Chlorella vulgaris* (*Trebouxiophyceae*) under low and high nitrogen supplies. In: *Algal Research* 16, S. 481–491. DOI: 10.1016/j.algal.2016.04.008.

- Liu, Tan; Chen, Zhihui; Xiao, Yunhua; Yuan, Mingmin; Zhou, Chenkai; Liu, Gang et al. (2022): Biochemical and Morphological Changes Triggered by Nitrogen Stress in the Oleaginous Microalga *Chlorella vulgaris*. In: *Microorganisms* 10 (3), S. 566. DOI: 10.3390/microorganisms10030566.
- Lowry, Oliver H.; Rosebrough, Nira J.; Farr, A. Lewis; Randall, Rose J. (1951): PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. In: *Journal of Biological Chemistry* 193 (1), S. 265–275. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)52451-6.
- Lu, Yan; Gehan, Jackson P.; Sharkey, Thomas D. (2005): Daylength and circadian effects on starch degradation and maltose metabolism. In: *Plant physiology* 138 (4), S. 2280–2291. DOI: 10.1104/pp.105.061903.
- Luo, Yunlong; Le-Clech, Pierre; Henderson, Rita K. (2017): Simultaneous microalgae cultivation and wastewater treatment in submerged membrane photobioreactors: A review. In: *Algal Research* 24, S. 425–437. DOI: 10.1016/j.algal.2016.10.026.
- Mannina, Giorgio; Ekama, George; Caniani, Donatella; Cosenza, Alida; Esposito, Giovanni; Gori, Riccardo et al. (2016): Greenhouse gases from wastewater treatment - A review of modelling tools. In: *The Science of the total environment* 551-552, S. 254–270. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.01.163.
- Mantovani, Marco; Marazzi, Francesca; Fornaroli, Riccardo; Bellucci, Micol; Ficara, Elena; Mezzanotte, Valeria (2020): Outdoor pilot-scale raceway as a microalgae-bacteria side-stream treatment in a WWTP. In: *The Science of the total environment* 710, S. 135583. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.135583.
- Marbelia, L.; Bilad, M. R.; Passaris, I.; Discart, V.; Vandamme, D.; Beuckels, A. et al. (2014): Membrane photobioreactors for integrated microalgae cultivation and nutrient remediation of membrane bioreactors effluent. In: *Bioresource Technology* 163, S. 228–235. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.04.012.
- Masojídek, Jiří; Kopecký, Jiří; Giannelli, Luca; Torzillo, Giuseppe (2011): Productivity correlated to photobiochemical performance of *Chlorella* mass cultures grown outdoors in thin-layer cascades. In: *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 38 (2), S. 307–317. DOI: 10.1007/s10295-010-0774-x.
- Masojídek, Jiří; Lhotský, Richard; Štěrbová, Karolína; Zittelli, Graziella Chini; Torzillo, Giuseppe (2023): Solar bioreactors used for the industrial production of microalgae. In: *Appl Microbiol Biotechnol*, S. 1–20. DOI: 10.1007/s00253-023-12733-8.
- Masojídek, Jiří; Ranglová, Karolína; Lakatos, Gergely Ernő; Silva Benavides, Ana Margarita; Torzillo, Giuseppe (2021): Variables Governing Photosynthesis and Growth in Microalgae Mass Cultures. In: *Processes* 9 (5), S. 820. DOI: 10.3390/pr9050820.
- Massé, Anthony; Arab, Oumnia; Séchet, Véronique; Jaouen, Pascal; Pontié, Maxime; Sabiri, Nour-Eddine; Plantier, Séverine (2015): Performances of dead-end ultrafiltration of seawater: From the filtration and backwash efficiencies to the membrane fouling mechanisms. In: *Separation and Purification Technology* 156, S. 512–521. DOI: 10.1016/j.seppur.2015.10.044.
- Mata, T. M.; Martins, A. A.; Caetano, N. S. (2012): Microalgae processing for biodiesel production. In: Juan A. Melero und Rafael Luque (Hg.): *Advances in biodiesel production. Processes and technologies*. Oxford: Woodhead Pub Ltd (Woodhead Publishing series in energy, no. 39), S. 204–231.

- Melin, T.; Jefferson, B.; Bixio, D.; Thoeye, C.; Wilde, W. de; Koning, J. de et al. (2006): Membrane bioreactor technology for wastewater treatment and reuse. In: *Desalination* 187 (1-3), S. 271–282. DOI: 10.1016/j.desal.2005.04.086.
- Mittag, Maria (2001): Circadian rhythms in microalgae. In: *International Review of Cytology*, Bd. 206: Academic Press, S. 213–247. Online verfügbar unter <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0074769601060235>.
- Mittag, Maria; Kiaulehn, Stefanie; Johnson, Carl Hirschie (2005): The circadian clock in *Chlamydomonas reinhardtii*. What is it for? What is it similar to? In: *Plant physiology* 137 (2), S. 399–409. DOI: 10.1104/pp.104.052415.
- Mo, Weiwei; Soh, Lindsay; Werber, Jay R.; Elimelech, Menachem; Zimmerman, Julie B. (2015): Application of membrane dewatering for algal biofuel. In: *Algal Research* 11, S. 1–12. DOI: 10.1016/j.algal.2015.05.018.
- Mock, Thomas; Kroon, Bernd M. A. (2002): Photosynthetic energy conversion under extreme conditions--II: the significance of lipids under light limited growth in Antarctic sea ice diatoms. In: *Phytochemistry* 61 (1), S. 53–60. DOI: 10.1016/s0031-9422(02)00215-7.
- Mohsenpour, Seyedeh Fatemeh; Hennige, Sebastian; Willoughby, Nicholas; Adeloje, Adebayo; Gutierrez, Tony (2021): Integrating micro-algae into wastewater treatment: A review. In: *The Science of the total environment* 752, S. 142168. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.142168.
- Molina Grima, E.; Ación Fernández, F. G.; Robles Medina, A. (2013): Downstream Processing of Cell Mass and Products. In: Amos Richmond und Qiang Hu (Hg.): *Handbook of microalgal culture. Applied Phycology and Biotechnology*. Second edition. Chichester West Sussex UK: John Wiley & Sons Ltd, S. 267–309.
- Molina Grima, E.; Belarbi, E.-H; Ación Fernández, F.G; Robles Medina, A.; Chisti, Yusuf (2003): Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. In: *Biotechnology Advances* 20 (7-8), S. 491–515. DOI: 10.1016/S0734-9750(02)00050-2.
- Monfet, E.; Unc, A. (2017): Defining wastewaters used for cultivation of algae. In: *Algal Research* 24, S. 520–526. DOI: 10.1016/j.algal.2016.12.008.
- Mundt, Florian; Hanelt, Dieter; Harms, Lars; Heinrich, Sandra (2019): Darkness-induced effects on gene expression in *Cosmarium crenatum* (Zygnematophyceae) from a polar habitat. In: *Scientific reports* 9 (1), S. 10559. DOI: 10.1038/s41598-019-47041-7.
- Muylaert, K.; Bastiaens, L.; Vandamme, D.; Gouveia, L. (2017): Harvesting of microalgae: Overview of process options and their strengths and drawbacks. In: Cristina Gonzalez-Fernandez und Raúl Muñoz (Hg.): *Microalgae-based biofuels and bioproducts. From feedstock cultivation to end-products*. Duxford, Cambridge, MA, Kidlington: Woodhead Publishing an imprint of Elsevier (Woodhead Publishing series in energy), S. 113–132.
- Nagarajan, Dillirani; Lee, Duu-Jong; Chen, Chun-Yen; Chang, Jo-Shu (2020): Resource recovery from wastewaters using microalgae-based approaches: A circular bioeconomy perspective. In: *Bioresource Technology* 302, S. 122817. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.122817.
- Ogbonna, James C.; Tanaka, Hideo (1996): Night biomass loss and changes in biochemical composition of cells during light/dark cyclic culture of *Chlorella pyrenoidosa*. In: *Journal of Fermentation and Bioengineering* 82 (6), S. 558–564. DOI: 10.1016/S0922-338X(97)81252-4.
- Ortiz Tena, Franziska; Ranglová, Karolína; Kubač, David; Steinweg, Christian; Thomson, Claudia; Masojidek, Jiří; Posten, Clemens (2021): Characterization of an aerated submerged

- hollow fiber ultrafiltration device for efficient microalgae harvesting. In: *Eng. Life Sci.* 21 (10), S. 607–622. DOI: 10.1002/elsc.202100052.
- Ortiz-Tena, Jose G.; Rühmann, Broder; Schieder, Doris; Sieber, Volker (2016): Revealing the diversity of algal monosaccharides: Fast carbohydrate fingerprinting of microalgae using crude biomass and showcasing sugar distribution in *Chlorella vulgaris* by biomass fractionation. In: *Algal Research* 17, S. 227–235. DOI: 10.1016/j.algal.2016.05.008.
- Oswald, W. J.; Gotaas, H. B.; Golueke, C. G.; Kellen, W. R.; Gloyna, E. F.; Hermann, E. R. (1957): Algae in Waste Treatment [with Discussion]. In: *Sewage and Industrial Wastes* 29 (4), S. 437–457. Online verfügbar unter <http://www.jstor.org/stable/25033322>.
- Posten, Clemens (2013): Microalgal Biotechnology - Potential and Production. Potential and Production. Unter Mitarbeit von Christian Walter. Berlin/Boston: De Gruyter Inc. Online verfügbar unter <https://ebookcentral.proquest.com/lib/kxp/detail.action?docID=893824>.
- Posten, Clemens (2018): Integrated bBioprocess engineering. Berlin: De Gruyter (De Gruyter graduate).
- Powell, Nicola; Shilton, Andy; Chisti, Yusuf; Pratt, Steven (2009): Towards a luxury uptake process via microalgae--defining the polyphosphate dynamics. In: *Water research* 43 (17), S. 4207–4213. DOI: 10.1016/j.watres.2009.06.011.
- Procházková, Gita; Brányiková, Irena; Zachleder, Vilém; Brányik, Tomáš (2014): Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae. In: *J Appl Phycol* 26 (3), S. 1359–1377. DOI: 10.1007/s10811-013-0154-9.
- Ranglová, K.; Lakatos, G. E.; Câmara Manoel, J. A.; Grivalský, T.; Masojídek, J. (2019): Rapid screening test to estimate temperature optima for microalgae growth using photosynthesis activity measurements. In: *Folia Microbiologica* 64 (5), S. 615–625. DOI: 10.1007/s12223-019-00738-8.
- Razaviarani, V.; Arab, G.; Lerdwanawattana, N.; Gadia, Y. (2023): Algal biomass dual roles in phycoremediation of wastewater and production of bioenergy and value-added products. In: *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 20 (7), S. 8199–8216. DOI: 10.1007/s13762-022-04696-6.
- Rezakazemi, Mashallah; Dashti, Amir; Harami, Hossein Riasat; Hajilari, Nasibeh; Inamuddin (2018): Fouling-resistant membranes for water reuse. In: *Environ Chem Lett* 16 (3), S. 715–763. DOI: 10.1007/s10311-018-0717-8.
- Richmond, Amos; Hu, Qiang (Hg.) (2013): Handbook of microalgal culture. Applied Phycology and Biotechnology. Second edition. Chichester West Sussex UK: John Wiley & Sons Ltd.
- Robles, A.; Ruano, M. V.; Ribes, J.; Ferrer, J. (2013): Factors that affect the permeability of commercial hollow-fibre membranes in a submerged anaerobic MBR (HF-SAnMBR) system. In: *Water research* 47 (3), S. 1277–1288. DOI: 10.1016/j.watres.2012.11.055.
- Roostaei, Javad; Zhang, Yongli (2017): Spatially Explicit Life Cycle Assessment: Opportunities and challenges of wastewater-based algal biofuels in the United States. In: *Algal Research* 24, S. 395–402. DOI: 10.1016/j.algal.2016.08.008.
- Ru, Irene Tiong Kai; Sung, Yeong Yik; Jusoh, Malinna; Wahid, Mohd Effendy Abdul; Nagappan, Thilaghavani (2020): *Chlorella vulgaris* : a perspective on its potential for combining high biomass with high value bioproducts. In: *Applied Phycology* 1 (1), S. 2–11. DOI: 10.1080/26388081.2020.1715256.
- Safi, Carl; Zebib, Bachar; Merah, Othmane; Pontalier, Pierre-Yves; Vaca-Garcia, Carlos (2014): Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A

- review. In: *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 35, S. 265–278. DOI: 10.1016/j.rser.2014.04.007.
- Salim, S.; Shi, Z.; Vermuë, M. H.; Wijffels, R. H. (2013): Effect of growth phase on harvesting characteristics, autoflocculation and lipid content of *Ettlia texensis* for microalgal biodiesel production. In: *Bioresource Technology* 138, S. 214–221. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.03.173.
- Sambrook, Joseph; Russell, David William (2001): *Molecular cloning. A laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samori, Giulia; Samori, Chiara; Pistocchi, Rossella (2014): Nutrient removal efficiency and physiological responses of *Desmodesmus communis* at different HRTs and nutrient stress condition using different sources of urban wastewater effluents. In: *Applied biochemistry and biotechnology* 173 (1), S. 74–89. DOI: 10.1007/s12010-014-0792-7.
- Saúco, Carlos; Cano, Raúl; Marín, David; Lara, Enrique; Rogalla, Frank; Arbib, Zouhayr (2021): Hybrid wastewater treatment system based in a combination of high rate algae pond and vertical constructed wetland system at large scale. In: *Journal of Water Process Engineering* 43, S. 102311. DOI: 10.1016/j.jwpe.2021.102311.
- Schediwy, Kira; Trautmann, Andreas; Steinweg, Christian; Posten, Clemens (2019): Microalgal kinetics - a guideline for photobioreactor design and process development. In: *Engineering in life sciences* 19 (12), S. 830–843. DOI: 10.1002/elsc.201900107.
- Sforza, Eleonora; Calvaruso, Claudio; La Rocca, Nicoletta; Bertucco, Alberto (2018): Luxury uptake of phosphorus in *Nannochloropsis salina*: Effect of P concentration and light on P uptake in batch and continuous cultures. In: *Biochemical Engineering Journal* 134, S. 69–79. DOI: 10.1016/j.bej.2018.03.008.
- Sforza, Eleonora; Simionato, Diana; Giacometti, Giorgio Mario; Bertucco, Alberto; Morosinotto, Tomas (2012): Adjusted light and dark cycles can optimize photosynthetic efficiency in algae growing in photobioreactors. In: *PLOS ONE* 7 (6), e38975. DOI: 10.1371/journal.pone.0038975.
- Shah, Maulin P. (Hg.) (2023): *Sustainable Industrial Wastewater Treatment and Pollution Control*. 1st ed. 2023. Singapore: Springer Nature Singapore; Imprint Springer.
- Solmaz, Alper; Işık, Mustafa (2020): Optimization of membrane photobioreactor; the effect of hydraulic retention time on biomass production and nutrient removal by mixed microalgae culture. In: *Biomass and Bioenergy* 142, S. 105809. DOI: 10.1016/j.biombioe.2020.105809.
- Solovchenko, Alexei; Khozin-Goldberg, Inna; Selyakh, Irina; Semenova, Larisa; Ismagulova, Tatiana; Lukyanov, Alexandr et al. (2019a): Phosphorus starvation and luxury uptake in green microalgae revisited. In: *Algal Research* 43, S. 101651. DOI: 10.1016/j.algal.2019.101651.
- Solovchenko, Alexei; Verschoor, Antonie M.; Jablonowski, Nicolai D.; Nedbal, Ladislav (2016): Phosphorus from wastewater to crops: An alternative path involving microalgae. In: *Biotechnology Advances* 34 (5), S. 550–564. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2016.01.002.
- Solovchenko, Alexei E.; Ismagulova, Tatiana T.; Lukyanov, Alexandr A.; Vasileva, Svetlana G.; Konyukhov, Ivan V.; Pogosyan, Sergei I. et al. (2019b): Luxury phosphorus uptake in microalgae. In: *J Appl Phycol* 31 (5), S. 2755–2770. DOI: 10.1007/s10811-019-01831-8.
- Song, Lianfa (1998): Flux decline in crossflow microfiltration and ultrafiltration: mechanisms and modeling of membrane fouling. In: *Journal of Membrane Science* 139 (2), S. 183–200. DOI: 10.1016/S0376-7388(97)00263-9.

- SOROKIN, C.; MYERS, J. (1957): The course of respiration during the life cycle of *Chlorella* cells. In: *J Gen Physiol* 40 (4), S. 579–592. DOI: 10.1085/jgp.40.4.579.
- Soto-Ramírez, Robinson; Tavernini, Luigi; Zúñiga, Héctor; Poirrier, Paola; Chamy, Rolando (2021): Study of microalgal behaviour in continuous culture using photosynthetic rate curves: The case of chlorophyll and carotenoid production by *Chlorella vulgaris*. In: *Aquaculture Research* 52 (8), S. 3639–3648. DOI: 10.1111/are.15208.
- Stanier, R. Y.; Kunisawa, R.; Mandel, M.; Cohen-Bazire, G. (1971): Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). In: *Bacteriological reviews* 35 (2), S. 171–205. DOI: 10.1128/br.35.2.171-205.1971.
- Starr, Richard C.; Zeikus, Jeffrey A. (1993): UTEX-THE CULTURE COLLECTION OF ALGAE AT THE UNIVERSITY OF TEXAS AT AUSTIN 1993 LIST OF CULTURES1. In: *Journal of Phycology* 29 (s2), S. 1–106. DOI: 10.1111/j.0022-3646.1993.00001.x.
- Stumm, Werner; Morgan, James J. (1996): Aquatic chemistry. Chemical equilibria and rates in natural waters. Third edition. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore: John Wiley & Sons Inc (A Wiley-Interscience publication). Online verfügbar unter <http://www.loc.gov/catdir/bios/wiley042/94048319.html>.
- Suzuki, Lena; Johnson, Carl Hirschie (2001): ALGAE KNOW THE TIME OF DAY: CIRCADIAN AND PHOTOPERIODIC PROGRAMS. In: *Journal of Phycology* 37 (6), S. 933–942. DOI: 10.1046/j.1529-8817.2001.01094.x.
- Tagesschau.de (2023): Landwirtschaft im Klimawandel: Algen als Nährstoff der Zukunft? Tagesschau.de. Online verfügbar unter <https://www.tagesschau.de/multimedia/video/video-1231034.html>, zuletzt aktualisiert am 04.10.2023, zuletzt geprüft am 04.10.2023.
- Tauber, Joseph; Krampe, Jörg; Parravicini, Vanessa (2023): Klimarelevanz des Abwassersektors. In: *Österr Wasser- und Abfallw* 75 (3-4), S. 127–138. DOI: 10.1007/s00506-022-00924-y.
- Torzillo, G.; Sacchi, A.; Materassi, R.; Richmond, A. (1991): Effect of temperature on yield and night biomass loss in *Spirulina platensis* grown outdoors in tubular photobioreactors. In: *J Appl Phycol* 3 (2), S. 103–109. DOI: 10.1007/BF00003691.
- Trautmann, Andreas Martin (2018): Prozessstrategien zur Beeinflussung der makromolekularen Zellzusammensetzung photoautotropher Mikroorganismen bei Kultivierungen im Labor- und Pilotmaßstab.
- Uduman, Nyomi; Qi, Ying; Danquah, Michael K.; Forde, Gareth M.; Hoadley, Andrew (2010): Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels. In: *Journal of Renewable and Sustainable Energy* 2 (1), S. 12701. DOI: 10.1063/1.3294480.
- Uggetti, Enrica; García, Joan; Álvarez, Juan Antonio; García-Galán, María Jesús (2018): Start-up of a microalgae-based treatment system within the biorefinery concept: from wastewater to bioproducts. In: *Water Science and Technology* 78 (1-2), S. 114–124. DOI: 10.2166/wst.2018.195.
- Umweltbundesamt: Energieeffizienz kommunale Kläranlagen (2011): Statistik Abwasserentsorgung. Hg. v. Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und nukleare Sicherheit. Online verfügbar unter <https://www.bmu.de/themen/wasser-abfallboden/binnengewasser/statistik/statistik-abwasserentsorgung/>, zuletzt aktualisiert am 23.03.2017, zuletzt geprüft am 12.07.2019.

- Usman, Muhammad; Amin, Mahwish; Kamal, Iqra; Shahid, Ayesha; Xu, Jingliang; Alam, Md. Asraful et al. (2023): Algae-Mediated Resource Recovery from Urban Wastewater. In: *Curr Pollution Rep* 9 (2), S. 243–258. DOI: 10.1007/s40726-023-00254-x.
- van der Marel, Perry; Zwijnenburg, Arie; Kemperman, Antoine; Wessling, Matthias; Temmink, Hardy; van der Meer, Walter (2009): An improved flux-step method to determine the critical flux and the critical flux for irreversibility in a membrane bioreactor. In: *Journal of Membrane Science* 332 (1-2), S. 24–29. DOI: 10.1016/j.memsci.2009.01.046.
- van Hoek, C. den (1993): Algen. 5 Tabellen. 3., neubearb. Aufl. Stuttgart: Thieme (Nultsch-Reihe).
- VDI-Gesellschaft Verfahrenstechnik und Chemieingenieurwesen (2013): VDI-Wärmeatlas. Mit 320 Tabellen. 11., bearb. und erw. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer Vieweg (VDI/-Buch)].
- Vera, Luisa; González, Enrique; Ruigómez, Ignacio; Gómez, Jenniffer; Delgado, Sebastián (2015): Analysis of backwashing efficiency in dead-end hollow-fibre ultrafiltration of anaerobic suspensions. In: *Environmental science and pollution research international* 22 (21), S. 16600–16609. DOI: 10.1007/s11356-015-4857-0.
- Villarroel, Rafael; Delgado, Sebastián; González, Enrique; Morales, Míriam (2013): Physical cleaning initiation controlled by transmembrane pressure set-point in a submerged membrane bioreactor. In: *Separation and Purification Technology* 104, S. 55–63. DOI: 10.1016/j.seppur.2012.10.047.
- Viruela, Alexandre; Robles, Ángel; Durán, Freddy; Ruano, María Victoria; Barat, Ramón; Ferrer, José; Seco, Aurora (2018): Performance of an outdoor membrane photobioreactor for resource recovery from anaerobically treated sewage. In: *Journal of Cleaner Production* 178, S. 665–674. DOI: 10.1016/j.jclepro.2017.12.223.
- Wang, Jing-Han; Zhang, Tian-Yuan; Dao, Guo-Hua; Xu, Xue-Qiao; Wang, Xiao-Xiong; Hu, Hong-Ying (2017): Microalgae-based advanced municipal wastewater treatment for reuse in water bodies. In: *Appl Microbiol Biotechnol* 101 (7), S. 2659–2675. DOI: 10.1007/s00253-017-8184-x.
- Wang, Song; Said, Inamullah Hakeem; Thorstenson, Candice; Thomsen, Claudia; Ullrich, Matthias S.; Kuhnert, Nikolai; Thomsen, Laurenz (2018): Pilot-scale production of antibacterial substances by the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. In: *Algal Research* 32, S. 113–120. DOI: 10.1016/j.algal.2018.03.014.
- Wang, Zhiwei; Ma, Jinxing; Tang, Chuyang Y.; Kimura, Katsuki; Wang, Qiaoying; Han, Xiaomeng (2014): Membrane cleaning in membrane bioreactors: A review. In: *Journal of Membrane Science* 468, S. 276–307. DOI: 10.1016/j.memsci.2014.05.060.
- Wellburn, Alan R. (1994): The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. In: *Journal of Plant Physiology* 144 (3), S. 307–313. DOI: 10.1016/S0176-1617(11)81192-2.
- Wiącek, J.; Stasiak, M. (2018): Effect of the particle size ratio on the structural properties of granular mixtures with discrete particle size distribution. In: *Granular Matter* 20 (2), S. 1–9. DOI: 10.1007/s10035-018-0800-7.
- Winter, L. de; Cabanelas, I.T.D.; Órfão, A. N.; Vaessen, E.; Martens, D. E.; Wijffels, R. H.; Barbosa, M. J. (2017a): The influence of day length on circadian rhythms of *Neochloris oleoabundans*. In: *Algal Research* 22, S. 31–38. DOI: 10.1016/j.algal.2016.12.001.
- Winter, Lenneke de; Cabanelas, Iago Teles Dominguez; Martens, Dirk E.; Wijffels, René H.; Barbosa, Maria J. (2017b): The influence of day/night cycles on biomass yield and composi-

- tion of *Neochloris oleoabundans*. In: *Biotechnol Biofuels* 10 (1), S. 104. DOI: 10.1186/s13068-017-0762-8.
- Winter, Lenneke de; Klok, Anne J.; Cuaresma Franco, Maria; Barbosa, Maria J.; Wijffels, René H. (2013a): The synchronized cell cycle of *Neochloris oleoabundans* and its influence on biomass composition under constant light conditions. In: *Algal Research* 2 (4), S. 313–320. DOI: 10.1016/j.algal.2013.09.001.
- Winter, Lenneke de; Klok, Anne J.; Cuaresma Franco, Maria; Barbosa, Maria J.; Wijffels, René H. (2013b): The synchronized cell cycle of *Neochloris oleoabundans* and its influence on biomass composition under constant light conditions. In: *Algal Research* 2 (4), S. 313–320. DOI: 10.1016/j.algal.2013.09.001.
- Winter, Lenneke de; Schepers, Lutz W.; Cuaresma, Maria; Barbosa, Maria J.; Martens, Dirk E.; Wijffels, René H. (2014): Circadian rhythms in the cell cycle and biomass composition of *Neochloris oleoabundans* under nitrogen limitation. In: *Journal of biotechnology* 187, S. 25–33. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2014.07.016.
- Wu, Jinling; Le-Clech, Pierre; Stuetz, Richard M.; Fane, Anthony. G.; Chen, Vicki (2008a): Effects of relaxation and backwashing conditions on fouling in membrane bioreactor. In: *Journal of Membrane Science* 324 (1-2), S. 26–32. DOI: 10.1016/j.memsci.2008.06.057.
- Wu, Zhichao; Wang, Zhiwei; Huang, Shengsan; Mai, Suihai; Yang, Caifeng; Wang, Xinhua; Zhou, Zhen (2008b): Effects of various factors on critical flux in submerged membrane bioreactors for municipal wastewater treatment. In: *Separation and Purification Technology* 62 (1), S. 56–63. DOI: 10.1016/j.seppur.2007.12.016.
- Xin, Li; Hu, Hong-Ying; Ke, Gan; Sun, Ying-xue (2010): Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. In: *Bioresource Technology* 101 (14), S. 5494–5500. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.02.016.
- Yamamoto, Maki; Fujishita, Mariko; Hirata, Aiko; Kawano, Shigeyuki (2004): Regeneration and maturation of daughter cell walls in the autospore-forming green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). In: *J Plant Res* 117 (4), S. 257–264. DOI: 10.1007/s10265-004-0154-6.
- Ye, J.; Sha, J.; Liu, Q.; Zhang, X.; Hu, Q.; Chen, Y. (2019): Influence of growth phase on the harvesting of *Scenedesmus acuminatus* using ultrafiltration. In: *Science of the Total Environment* 660, S. 25–31. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.01.020.
- Ye, Yuanyao; Ngo, Huu Hao; Guo, Wenshan; Chang, Soon Woong; Nguyen, Dinh Duc; Varjani, Sunita et al. (2021): Bio-membrane based integrated systems for nitrogen recovery in wastewater treatment: Current applications and future perspectives. In: *Chemosphere* 265, S. 129076. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.129076.
- YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. (1954): The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. In: *The Biochemical journal* 57 (3), S. 508–514. DOI: 10.1042/bj0570508.
- Zhang, Meijia; Yao, Lishan; Maleki, Esmat; Liao, Bao-Qiang; Lin, Hongjun (2019): Membrane technologies for microalgal cultivation and dewatering: Recent progress and challenges. In: *Algal Research* 44, S. 101686. DOI: 10.1016/j.algal.2019.101686.
- Zhang, Xuezhi; Amendola, Pasquale; Hewson, John C.; Sommerfeld, Milton; Hu, Qiang (2012): Influence of growth phase on harvesting of *Chlorella zofingiensis* by dissolved air flotation. In: *Bioresource Technology* 116, S. 477–484. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.04.002.

- Zhang, Xuezhi; Hu, Qiang; Sommerfeld, Milton; Puruhito, Emil; Chen, Yongsheng (2010): Harvesting algal biomass for biofuels using ultrafiltration membranes. In: *Bioresource Technology* 101 (14), S. 5297–5304. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.02.007.
- Zhang, Y.; Fu, Q. (2018): Algal fouling of microfiltration and ultrafiltration membranes and control strategies. A review. In: *Separation and Purification Technology* 203, S. 193–208. DOI: 10.1016/j.seppur.2018.04.040.
- Zhao, Fangchao; Su, Yiming; Tan, Xiaobo; Chu, Huaqiang; Zhang, Yalei; Yang, Libin; Zhou, Xuefei (2015): Effect of temperature on extracellular organic matter (EOM) of *Chlorella pyrenoidosa* and effect of EOM on irreversible membrane fouling. In: *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces* 136, S. 431–439. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.09.031.
- Zhao, Zhenyu; Muylaert, Koenraad; F.J. Vankelecom, Ivo (2023): Applying membrane technology in microalgae industry: A comprehensive review. In: *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 172, S. 113041. DOI: 10.1016/j.rser.2022.113041.
- Zhu, Shunni; Huang, Wei; Xu, Jin; Wang, Zhongming; Xu, Jingliang; Yuan, Zhenhong (2014): Metabolic changes of starch and lipid triggered by nitrogen starvation in the microalga *Chlorella zofingiensis*. In: *Bioresource Technology* 152, S. 292–298. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.10.092.
- Zhukova, N. V. (2007): Changes in the fatty acid composition of symbiotic dinoflagellates from the hermatypic coral *Echinopora lamellosa* during adaptation to the irradiance level. In: *Russ J Plant Physiol* 54 (6), S. 763–769. DOI: 10.1134/S1021443707060076.
- Ziegler, J. G.; Nichols, N. B. (1993): Optimum Settings for Automatic Controllers. In: *J. Dyn. Sys., Meas., Control* 115 (2B), S. 220–222. DOI: 10.1115/1.2899060.



# 8 Anhang

## 8.1 Studentische Arbeiten

Simon Eppel, Praxissemester, *Charakterisierung einer Filtrationsanlage zur nachhaltigen Abtrennung von Mikroalgen*, 2019

Simon Eppel, Bachelorarbeit, *Entwicklung einer Strategie zur Fouling-Kontrolle mittels Rückspülen für eine Membran Filtrationsanlage im Labor-Maßstab*, 2019

Paul Klausning, Bachelorarbeit, *Charakterisierung einer Membranfiltrationsanlage im Labormaßstab zur Nährstoffrückgewinnung mit Mikroalgen aus Abwasser*, 2020

Kristin Neubauer, Masterarbeit, *Entwicklung und Simulation eines Versuchskonzeptes zur optimalen Nährstoffausnutzung in der Abwasseraufbereitung durch Mikroalgen mittels Zellrückführung*, 2020

Lutz Joachim Urbanek, Masterarbeit, *Modellentwicklung für eine Strategie zur optimalen Nährstoffrückgewinnung in der Abwasseraufbereitung mittels Mikroalgen*, 2020

Jannis Gasmi, Masterarbeit, *Entwicklung einer Erntestrategie zur optimalen Nährstoffausnutzung in der Abwasseraufbereitung mittels Mikroalgen*, 2021

Victoria Bickel, Bachelorarbeit, *Untersuchung der Nährstoffaufnahme von Mikroalgen bei kontinuierlichen Kultivierungen zur optimalen Nährstoffausnutzung in der Abwasseraufbereitung*, 2021

Jonathan Noll, Bachelorarbeit, *Optimierung der kontinuierlichen Abwasseraufbereitung in meinem Membran-Photobioreaktor mittels Mikroalgen*, 2021

## 8.2 Material und Methoden

### 8.2.1 Medien

#### Bold-Basal Medium (BB-Medium)

Tabelle 8-1: Zusammensetzung des verwendeten Bold-Basal Mediums zur Mikroalgenkultivierung nach Bischoff, H. W. & Bold, H. C. 1963, modifiziert nach Starr und Zeikus 1993 und Andersen 2009.

	Komponente	Konzentration in g·L <sup>-1</sup>
	NaNO <sub>3</sub>	0,2500
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,0750
	NaCl	0,0250
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,0750
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1750
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,0250
Spurenelemente	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,00882
	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,00144
	MoO <sub>3</sub>	0,00071
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,00157
	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,00049
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,01142
	EDTA	0,05000
	KOH	0,03100
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,00498
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (conc)	0,00184

#### TRIS-Acetat-Phosphat Medium (TAP-Medium)

Tabelle 8-2: Zusammensetzung des 1-fach konzentrierten TAP-Mediums für *Chlorella vulgaris* nach Gorman und Levine 1965 und Hutner et al. 1950.

	Komponente	Konzentration in g·L <sup>-1</sup>
P-Lösung & Salze	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,108
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,054
	NH <sub>4</sub> Cl	0,375
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,100
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,050
	EDTA-Na <sub>2</sub>	0,100
Spurenelemente	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,023
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,044
	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,010
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,010
	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,003
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,003
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,002

Modifiziertes Blue-Green 11 Medium (mBG11-Medium)

Tabelle 8-3: Zusammensetzung des eingesetzten und modifizierten mBG11-Mediums nach Stanier et al. 1971 zur Mikroalgenkultivierung.

Komponente	Konzentration in g·L <sup>-1</sup>	
NH <sub>4</sub> Cl	0,191	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,075	
NaCl	0,025	
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,036	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,056	
Spurenelemente	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,00022
	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,00181
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,00039
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,00008
	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,00005
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,00286
	Na-EDTA	0,05000
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,00498

Sekundäres Abwasser: AnMBR EffluentTabelle 8-4: Charakterisierung der Wasserqualität des AnMBR Abwassers (Lebensmittelindustrie) sowie des sekundären Abwassers (AnMBR Effluent) (Grossman et al. 2021) TSS: Gesamt-Schwebstoffe (engl.: *total suspended solids*), TOC: gesamter organischer Kohlenstoff (engl.: *total organic carbon*), DOC: gelöster organischer Kohlenstoff (engl.: *dissolved organic carbon*), TN: gesamter Stickstoff (engl.: *total nitrogen*), TP: gesamter Phosphor (engl.: *total phosphorus*), EC: Leitfähigkeit (engl.: *electric conductivity*).

Parameter	AnMBR Abwasser	AnMBR Effluent	Reduktion (%)
TSS (mg·L <sup>-1</sup> )	2093 ± 199	< 10	> 99,9
TOC (mg·L <sup>-1</sup> )	1520 ± 715	32,3 ± 6,5	97,9
DOC (mg·L <sup>-1</sup> )	916,2 ± 95,1	32,3 ± 6,5	96,5
TN (mg·L <sup>-1</sup> )	165 ± 81	153,7 ± 15,8	6,7
TP (mg·L <sup>-1</sup> )	9,9 ± 4,8	9,2 ± 4,5	7,1
pH	7,0 ± 0,2	7,3 ± 0,2	--
EC	2,4 ± 0,3	4,0 ± 0,4	--

Tabelle 8-5: A5-Mikro-Nährstoffe Stocklösung (1000 x) – Komponenten, Konzentration in der Stocklösung und finale Konzentration im AnMBR Effluent.

	Komponente	Konzentration	
		Stocklösung (g·L <sup>-1</sup> )	AnMBR Effluent (µM)
1	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,222	0,770
2	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,079	0,310
3	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,039	1,610
4	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,860	46,300
5	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1,810	9,150
6	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,050	0,172

Zur Herstellung von 1 L AnMBR Effluent wird 1 mL der A5-Mirko-Nährstoffe Stocklösung eingesetzt.

Tabelle 8-6: Fe-EDTA Stocklösung (1000 x) zur Supplementierung des AnMBR Effluents.

Lösung	Komponente	Konzentration
A	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	100 g/500 mL
B	Na <sub>2</sub> EDTA	16 g/500 mL

Die Lösungen A und B werden nach ihrer separaten Herstellung vereint und im Anschluss autoklaviert. Zur Herstellung von 1 L AnMBR Effluent wird 1 mL der Fe-EDTA Stocklösung eingesetzt.

## 8.2.2 Vorbereitung des Photobioreaktorsystems zur Kultivierung

Nach dem Zusammenbau des Photobioreaktor-Systems entsprechend der gewünschten Betriebsweise, wurden Pumpen, MFCs sowie der Lichtmantel kalibriert werden. Vor Beginn einer Kultivierung wurde das System zu sterilisiert. Der Reaktor selbst war in situ autoklavierbar, hierfür wurde das Abluftventil geschlossen, um einen Druckaufbau zu ermöglichen. Die Reaktorperipherie wurde davon getrennt im Laborautoklav sterilisiert. Die eingesetzten Vorratsflaschen waren hierfür mit Anstechnadeln inklusive Kappe ausgestattet. Am Reaktordeckel und -boden wurden Einmal-Septen eingebaut, um eine aseptische Verbindung von Reaktor und Peripherie zu ermöglichen. Das Anstechen erfolgte unter Zuhilfenahme eines Ethanol-Wasser-Gemisches (76 % (v/v)). Nachdem der mit VE-Wasser gefüllte Glaszylinder für mindestens 20 min bei 121 °C sterilisiert wurde, konnte das frische Kulturmedium eingebracht werden. Vor dem Inokulieren war das Medium durch den Start der Begasung mit CO<sub>2</sub> zu sättigen, währenddessen wurde zudem die pH-Regulierung aktiviert. Mindestens 24 Stunden später konnte ein Aliquot des Mediums auf seine Sterilität hin überprüft werden. Nun war das Reaktor-System bereit für die Zugabe des Inokulums, wodurch die Kultivierung gestartet wurde. Wurde das System als MPBR eingesetzt, wurden der *Mini-Harvester* sowie alle Zu- und Ableitungen separat mit verdünnter Hypochlorit Lösung (2 % (v/v)) sterilisiert, mit sterilem Reinstwasser zu gespült und im Anschluss aseptisch an den PBR gekoppelt (siehe Reinigungsprotokoll *Mini-Harvester* in Kapitel 8.3.3).

### 8.2.3 Spezifikationen von Geräten, Materialien und Chemikalien

#### Eingesetzte Chemikalien

Tabelle 8-7: Auflistung der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Chemikalien zur Herstellung der verwendeten Kulturmedien und Puffer.

Summenformel /Abkürzung	Trivialname	Hersteller	Sitz
	Lowry-Reagenz L3540-1VL	Sigma Aldrich Corp.	St. Louis, USA
	Folinreagenz	Sigma Aldrich Corp.	St. Louis, USA
(C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ) <sub>n</sub>	Stärke nach Zulkowsky	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
BSA	Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH&Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	EDTA	Carl Roth GmbH&Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> NaO <sub>4</sub> S	SDS (Natriumlaurylsulfat)	Carl Roth GmbH&Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> O	Anthron	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS	DMSO	VWR International LLC	Radnor, USA
C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	TRIS(hydroxymethyl)aminomethan	Carl Roth GmbH&Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	Calciumchlorid - Dihydrat	VWR International LLC	Radnor, USA
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	Cobald-(II)-Nitrat - Hexahydrat	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	Kupfer-(II)-Sulfat - Pentahydrat	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	Eisen(II)-Sulfat Heptahydrat	Sigma Aldrich Corp.	St. Louis, USA
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure	VWR International LLC	Radnor, USA
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Borsäure	Promega Corp.	Madison, USA
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dikaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH&Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	Magnesiumsulfat - Heptahydrat	VWR International LLC	Radnor, USA
MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	Mangan-(II)-chlorid - Tetrahydrat	Carl Roth GmbH&Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	Natriummolybdat - Dihydrat	Sigma Aldrich Corp.	St. Louis, USA
NaCl	Natriumchlorid	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
NaOH	Natriumhydroxid	VWR International LLC	Radnor, USA
NH <sub>4</sub> Cl	Ammoniumchlorid	Carl Roth GmbH&Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
ZnSO <sub>4</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	Zinksulfat-Heptahydrat	VWR International LLC	Radnor, USA

Laborgeräte (Allgemein) und Labormaterialien

Tabelle 8-8: Auflistung der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Laborgeräte inklusive Peripherie sowie Verbrauchsmaterialien.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Spezifikation</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Sitz</b>
Analysenwaage	ABJ 320-4NM	Kern & Sohn GmbH	Balingen-Frommern, Deutschland
Gefriertrockner	Alpha 1-2 LD plus	Martin Christ GmbH	Osterode am Harz, Deutschland
Gilibrator	Gilian Gilibrator-2	Sensidyne LP.	Clearwater, USA
Gilibrator Messlösung	Gilian Gilibrator, Bubble Generator Soap Solution P/N 800450	Sensidyne LP.	Clearwater, USA
Glasfaserfilter	698, No. 516-0346, 0,7 µm	VWR International LLC	Radnor, USA
IC - automatische Probenvorlage	858 Professional Sample Processor	METROHM GmbH & Co. KG	Filderstadt, Deutschland
Ionenchromatograph (IC)	882 Compact IC plus	METROHM GmbH & Co. KG	Filderstadt, Deutschland
Kalibrationslösung pH Sonde pH4	Certipur ® Pufferlösung pH 4.00	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Kalibrationslösung pH Sonde pH7	Buffer Solution pH 7.00 (20°C)	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
Kugelmühle	MM 301	Retsch GmbH	Haan, Deutschland
Küvette, halbmikro	Polystyrol, 1,5 mL	Brand GmbH & Co. KG	Wertheim, Deutschland
Küvette, makro	Polystyrol, 2,5 mL	Brand GmbH & Co. KG	Wertheim, Deutschland
Lichtmikroskop	Scope A1 Axio,	Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH	Jena, Deutschland
Lichtmikroskop Kamera	ODC851-HDM OCH70351	Kern & Sohn GmbH	Balingen-Frommern, Deutschland
Lichtsensord (planar)	LI-190SA mit LI-250 Lichtmeter	LI-COR Biosciences Corp.	Lincoln, USA
Reflektometer	RQflex 20	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Reflektometer	RQflex 20	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Reflektometer Testkits	Reflectoquant, Supelco	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Reinstwasseranlage	Maxima Ultra Pure Water	ELGA Labwater	High Wycombe, UK
Spektrophotometer	Lambda 35	Perkin Elmer Inc.	Waltham, USA
Spritzenvorsatzfilter	SPHEROS, CA, 0,45 µm	Lab Logistics Group GmbH	Meckenheim, Deutschland
Sterilfilter	Midisart 2000	Sartorius Stedim Biotech S.A.	Aubagne, Frankreich
Sterilwerkbank	Safe2020	ThermoFischer Scientific Inc	Waltham, USA
Thermoschüttler	Biometra TS1 Thermo Shaker	Analytik Jena GmbH+Co. KG	Jena, Deutschland
Trockenschrank	UM 200 – 800	Memmert GmbH & Co. KG	Schwabach, Deutschland

Vortexer	VV3	VWR International LLC	Radnor, USA
Zentrifuge (groß)	ROTINA 420R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG	Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge (klein)	Mikro 22 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG	Tuttlingen, Deutschland

### Peripherie des Photobioreaktorsystems

Tabelle 8-9: Auflistung des in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Photobioreaktorsystems inklusive Peripherie.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Spezifikation</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Sitz</b>
Abgas-Analysator	Multor 610	Sick Maihak AG	Waldkirch, Deutschland
Heizstab	33484 No. 601	Bioengineering AG	Wald (Zurich), Schweiz
Kühlstab	F2158	Bioengineering AG	Wald (Zurich), Schweiz
Lichtmantel Bioreaktor	Eigenbau	BVT Institut KIT	Karlsruhe, Deutschland
Massflowcontroller CO <sub>2</sub>	MKS 1179B01311CSA	MKS Instruments Inc.	Andover, USA
Massflowcontroller Luft	MKS 1179B01312CSA	MKS Instruments Inc.	Andover, USA
OD-Sonde	AvaSpec-3648	Avantes BV	Apeldoorn, Niederlande
pH-Sonde	Easyferm Plus ARC 120	Hamilton Company	Reno, USA
pO <sub>2</sub> -Sonde	VisiFerm DO ARC 120	Hamilton Company	Reno, USA
Pumpe Base	BioEngineering 52211.1	Bioengineering AG	Wald (Zurich), Schweiz
Pumpe Reaktor-Ablauf	BioEngineering 52211.1	Bioengineering AG	Wald (Zurich), Schweiz
Pumpe Reaktor-Zulauf (Medium)	BioEngineering 52211.1	Bioengineering AG	Wald (Zurich), Schweiz
Sparger	--	Bioengineering AG	Wald (Zurich), Schweiz
Strömungsbrecher	--	Bioengineering AG	Wald (Zurich), Schweiz
Temperaturfühler	AG21498.1	Bioengineering AG	Wald (Zurich), Schweiz
Waage Reaktor-Zulauf (Medium)	FKB 36K0.1	Kern & Sohn GmbH	Balingen-Frommern, Deutschland
Waage Base	EW-4200-2NM	Kern & Sohn GmbH	Balingen-Frommern, Deutschland

Peripherie des *Harvesters*Tabelle 8-10: Spezifikation der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Membran-Filtrationsanlage *Harvester* inklusive Peripherie.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Spezifikation</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Sitz</b>
Absorptionssensor Messumformer	Liquiline CM44x	Endress+Hauser AG	Reinach, Schweiz
Absorptionssensor Sensorkopf	Turbimax CUS50D	Endress+Hauser AG	Reinach, Schweiz
Drucksensor (Füllstand)	P-131	Tecson GmbH & Co KG	Felde, Deutschland
Durchflussmesser Messumformer	IFC 100	Ludwig Krohne GmbH & Co. KG	Duisburg, Deutschland
Durchflussmesser Sensor	Optiflux 5000 DN 2,5	Ludwig Krohne GmbH & Co. KG	Duisburg, Deutschland
Korpus <i>Harvester</i>	Eigenbau	BVT Institut KIT	Karlsruhe, Deutschland
Manometer	MS – 10663	WIKA	Klingenberg am Main, Deutschland
Massflowcontroller	MKS Type 1579	Alexander Wiegand SE & Co. KG	Andover, USA
Membranmodul	Puron ® Hollow Fiber Rows	MKS Instruments Inc.	Wichita, Kansas, USA
Niveausensoren	AC 004 Niveau	Koch Separation Solutions, Inc.	Essen, Deutschland
Pumpe Filtrat Antrieb	Ismatec MCP-Z Process ISM918A	autosen gmbh	Vernon Hills, Illinois
Pumpe Filtrat Pumpenkopf	Ismatec Z-201, MI0023	Cole-Parmer Instrument Company, LLC.	Vernon Hills, Illinois
Pumpe <i>Harvester</i> Zulauf	Ismatec Flowmaster FMT300 ISM 1020	Cole-Parmer Instrument Company, LLC.	Vernon Hills, Illinois
Pumpe Retentat Antrieb	Ismatec ecoline VC Easy-Load ISM 1077A	Cole-Parmer Instrument Company, LLC.	Vernon Hills, Illinois
Pumpe Retentat Pumpenkopf	Masterflex L/S 7518-10	Cole-Parmer Instrument Company, LLC.	Vernon Hills, Illinois
Schlauch sonstige Anlage	PharMed BPT 6.4 x 9,6mm	Saint-Gobain Life Sciences	Akron, USA
Schlauch Zulauf	TYGON-ST LMT-55 Standard/ 55 Shore	Cole-Parmer Instrument Company, LLC.	Vernon Hills, Illinois
Temperatursensor	AT 001	autosen gmbh	Essen, Deutschland

Peripherie des *Mini-Harvesters*

Tabelle 8-11: Spezifikation der in der vorliegenden Arbeit Membranfiltrationsanlage *Mini-Harvester* inklusive Peripherie für die Realisierung eines Membran-Photobioreaktors.  
 \* für *Mini-Harvester* Zulauf, Rücklaufstrom Retentat *Mini-Harvester* zu PBR, *Mini-Harvester* Ernte, PBR-Zulauf (Medium)

<b>Bezeichnung</b>	<b>Spezifikation</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Sitz</b>
Elektronischer Vakuumregler	ITV0000	SMC Corporation	Tokyo, Japan
Filtrat-Flasche	Nalgene™ PPCO-Vakuumflasche 1L	Nalgene Nunc International Corporation	Rochester, USA
Korpus <i>Mini-Harvester</i>	Eigenbau	MVM Institut KIT	Karlsruhe, Deutschland
Manometer	MS-106100	WIKA Alexander Wiegand SE & Co. KG	Klingenberg, Deutschland
Manometer Filtrat-Flasche	Rohrfedermanometer Typ 11.10 G ¼ -1 bis 0,6 bar	WIKA Alexander Wiegand SE & Co. KG	Klingenberg, Deutschland
Massflowcontroller	MKS 1179B01314CSA (10.000mL) Wagner MSR D5111 (1000mL)	MKS Instruments Inc. Wagner Mess- und Regeltechnik GmbH	Andover, USA Offenbach am Main, Deutschland
Mehrkanalpumpe Schläuche	SC0053T, SC0222T, SC0303, SC0308	Cole-Parmer Instrument Company, LLC.	Vernon Hills, Illinois
Mehrkanalpumpe*	Ismatec Reglo ICC	Cole-Parmer Instrument Company, LLC.	Vernon Hills, Illinois
Membranfasern	Puron ® Hollow Fiber Rows	Koch Separation Solutions, Inc.	Wichita, Kansas, USA
Niveausensoren	AC 004 Niveau	autosen gmbh	Essen, Deutschland
Temperatursensor	Pt100 Einschraubfühler		
Vakuum-Flasche	Nalgene™ PPCO-Vakuumflasche 5L	Nalgene Nunc International Corporation	Rochester, USA
Vakuumpumpe	Vakuumpumpsystem SC 920	KNF DAC GmbH	Hamburg, Deutschland
Waage Ernte	EW4200-2NM	Kern & Sohn GmbH	Balingen-Frommern, Deutschland
Waage Filtrat	EW4200-2NM	Kern & Sohn GmbH	Balingen-Frommern, Deutschland

## 8.2.4 Auswertung der Filtrations-Daten

### Temperaturabhängigkeit der Dichte

Zur Ermittlung des Filtrat-Volumenstromes der Filtrationsanlage *Mini-Harvester* wurde der gravimetrisch bestimmte Massenstrom unter Einbezug der temperaturabhängigen Dichte von Wasser  $\rho(T)$  (in  $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ ) in einem Volumenstrom umgerechnet. Aus den Daten des VDI Wärmeatlas (VDI-Gesellschaft Verfahrenstechnik und Chemieingenieurwesen 2013) zur Dichte von Wasser bei Temperaturen im Bereich zwischen 18 - 28 °C (Abbildung 8-1) wurde eine Ausgleichsfunktion (Polynom dritten Grades,  $R^2 = 1,00$ ) mit folgenden Koeffizienten (Gleichung (8-1)) ermittelt. Die Gleichung wurde für die Auswertung eingesetzt.

$$\rho(T) = 999,98009 + 0,04167 \cdot T - 0,00716 \cdot T^2 + 3,19614 \cdot 10^{-5} \cdot T^3 \quad (8-1)$$

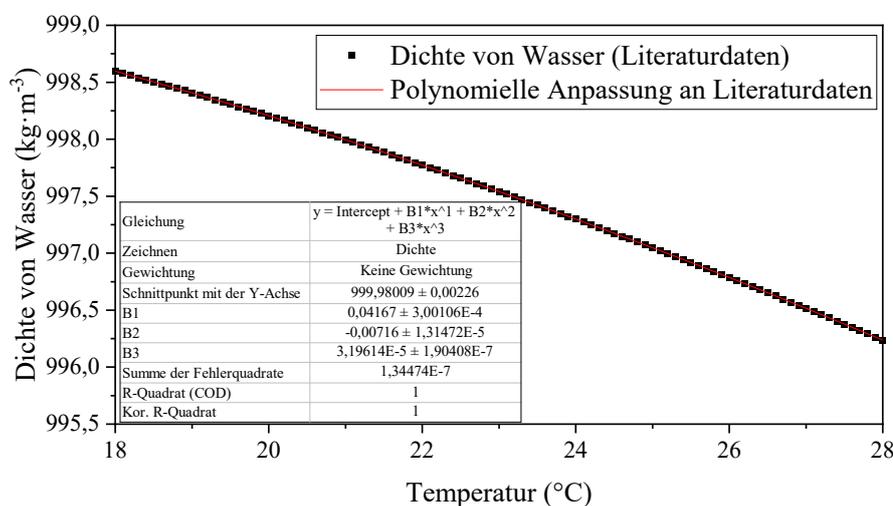


Abbildung 8-1: Temperaturabhängige Dichte  $\rho(T)$  von Wasser zwischen 18 und 28 °C: Literaturdaten und polynomielle Ausgleichsfunktion.

### Temperaturabhängigkeit der dynamischen Viskosität

Zur Bestimmung des Membranwiderstandes vor/während der Filtration wird die temperaturabhängige dynamische Viskosität  $\mu_T$  von Wasser (in  $\mu\text{Pa}\cdot\text{s}^{-1}$ ) eingesetzt. Aus den Daten des VDI Wärmeatlas (VDI-Gesellschaft Verfahrenstechnik und Chemieingenieurwesen 2013) zur dynamischen Viskosität von Wasser bei Temperaturen im Bereich zwischen 20 - 30 °C wurde eine Ausgleichsfunktion (linear,  $R^2 = 1,00$ ) mit folgenden Koeffizienten (Gleichung (8-2)) ermittelt. Die Gleichung wurde für die Auswertung eingesetzt.

$$\mu(T) = -20,43 \cdot T + 1410,6 \quad (8-2)$$

## 8.3 Filtrationsanlagen

### 8.3.1 Technische Zeichnung des *Harvesters*

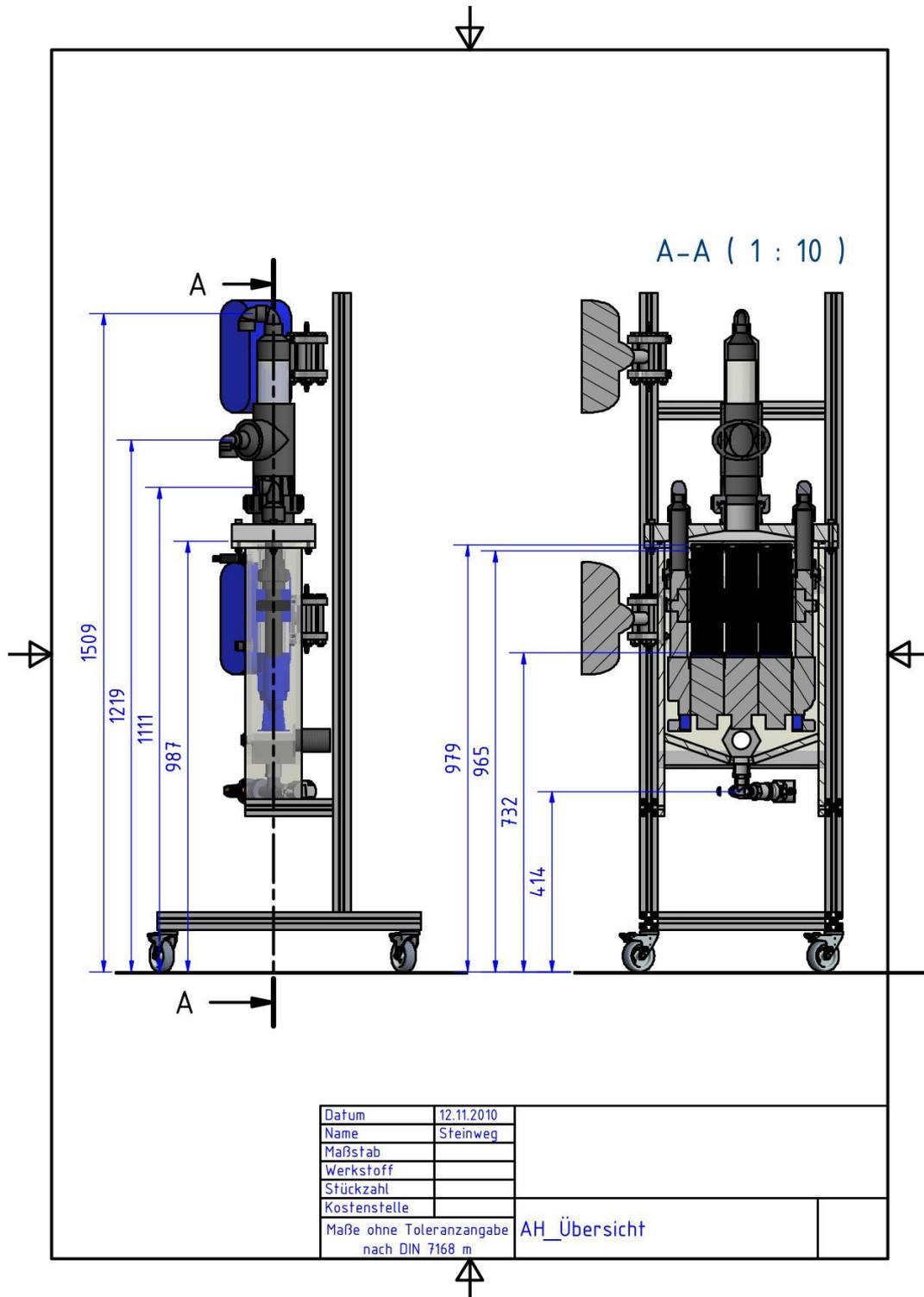


Abbildung 8-2: Technische Zeichnung der Filtrationsanlage *Harvester*.

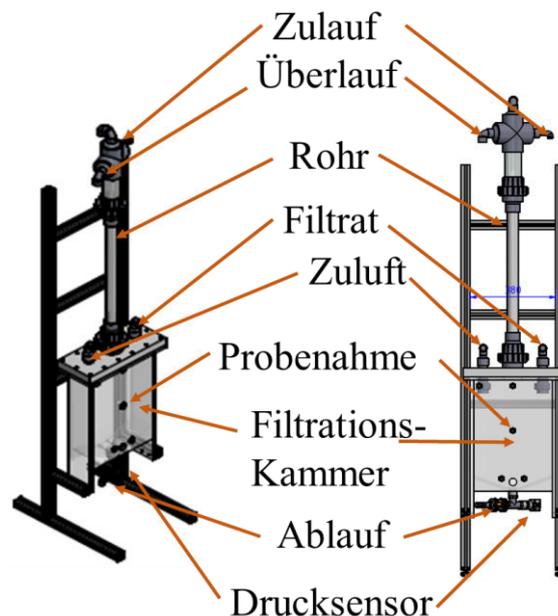


Abbildung 8-3: Hauptkomponenten der Filtrationsanlage *Harvester*.

### 8.3.2 Reinigungsprotokoll *Harvester*

Bei kurzen Standzeiten (<24 h) ist es ausreichend, den kompletten *Harvester* mit frischem VE-Wasser im Filtrations-Betrieb zu spülen. Vor beziehungsweise nach längeren Standzeiten ( $\geq 96$  Stunden), muss der *Harvester* gründlich gereinigt werden.

Im Zuge der Reinigung wird der *Harvester* zunächst im Filtrations-Betrieb mit VE-Wasser gespült (5-10 Minuten), wobei die Membranbelüftung aktiv ist. Ein periodisches An- und Abschalten der Belüftung unterstützt das Ausspülen von angehafteten Partikeln. Im Anschluss wird der *Harvester* vollständig auseinander gebaut und per Hand gereinigt. Hierzu zählt auch die Demontage aller Schläuche und Sensoren, soweit möglich. Die Filter-Einheit wird nach dem Herausnehmen in einem Behälter mit Wasser gelagert. Die losen Teile werden im Waschbecken unter Zuhilfenahme von Schwamm/Bürste und Spülmittel (und bei Bedarf: verdünnter Essigreiniger) vorsichtig gesäubert und im Anschluss sorgfältig mit VE-Wasser abgespült und zum Trocknen ausgelegt. Die Filtrations-Kammer des *Harvesters* aus Plexiglas ist dabei besonders vorsichtig zu behandeln, um Kratzer zu vermeiden.

Das Membranmodul wird zunächst mechanisch durch Abspülen mit VE-Wasser gereinigt, hierbei ist besondere Vorsicht geboten, um die Membranfasern nicht zu beschädigen. Anschließend erfolgt eine chemische Reinigung. Die Reinigungslösung ist eine verdünnte Natrium-Hypochlorit Lösung mit einem Gehalt zwischen 3-5 % (v/v), angepasst an den Verschmutzungsgrad des Moduls. Das Membranmodul ist für die Dauer von >12 Stunden im Dunkeln in der Reinigungslösung zu inkubieren und im Anschluss äußerst gründlich mit VE-Wasser zu spülen. Die Natrium-Hypochlorit-Lösung kann nach einer Neutralisation mit  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  im Abfluss entsorgt werden.

Nach dem Zusammenbau des *Harvesters* inklusive Membranmodul, wird die Anlage mit VE-Wasser gefüllt und der Filtrations-Betrieb für kurze Zeit (~10 Minuten) gestartet, um eventuelle Reste von Reinigungsmitteln auszuspülen sowie alle Schläuche und Strecken mit Flüssigkeit zu füllen.

Im Anschluss an das genannte Prozedere ist der *Harvester* einsatzbereit.

### 8.3.3 Reinigungsprotokoll *Mini-Harvester*

Vor jedem Filtrationsexperiment ist der *Mini-Harvester* inklusive der eingesetzten Schläuche gründlich zu reinigen. Hierfür ist die Anlage zunächst auseinander zu bauen und alle Einzelteile im Waschbecken unter Zuhilfenahme von Schwamm/Bürste und Spülmittel (und bei Bedarf: verdünnter Essigreiniger) vorsichtig zu säubern und im Anschluss sorgfältig mit VE-Wasser abzuspülen. Der Faserhalter ist zunächst mit behandschuhten Händen unter VE-Wasser vorsichtig zu reinigen und zum Trocknen auszulegen. Parallel dazu werden die Fasern in eine Flasche (Schott-Flasche mit einem Fassungsvermögen von 1 L) getaucht, welche die Reinigungslösung enthält, und für mindestens 12 Stunden inkubiert. Es ist dabei darauf zu achten, dass die Stellen, an welchen die Fasern in den Faserhalter geklebt wurden, nicht in die Flüssigkeit eintauchen, um ein Ablösen des Klebstoffes zu vermeiden. Die Reinigungslösung ist eine verdünnte Natrium-Hypochlorit Lösung mit einem Gehalt zwischen 2 % (v/v).

Im Anschluss wird der *Mini-Harvester* wieder zusammengebaut, mit VE-Wasser gefüllt und der Filtrations-Betrieb für einige Minuten gestartet, um alle Schläuche mit Flüssigkeit zu füllen.

Soll der *Mini-Harvester* steril im Zusammenhang mit einer Algenkultivierung betrieben werden, ist ein weiterer Reinigungsschritt notwendig. Hierfür wird die Reinigungslösung in ein Vorlage-Gefäß gegeben und der Filtrations-Betrieb für 30 Minuten gestartet. Dabei ist unbedingt darauf zu achten, dass alle Teile und Strecken, welche im Anschluss mit einer Algensuspension in Kontakt kommen beziehungsweise an den Bioreaktor angeschlossen sind, von der Reinigungslösung durchströmt werden. Nach Ablauf der Sterilisations-Zeit ist die Anlage mit sterilem VE-Wasser mindestens drei Mal zu spülen, bevor sie an den Bioreaktor gekoppelt werden kann und für das Experiment zur Verfügung steht.

### 8.3.4 Faserhalter am *Mini-Harvester*

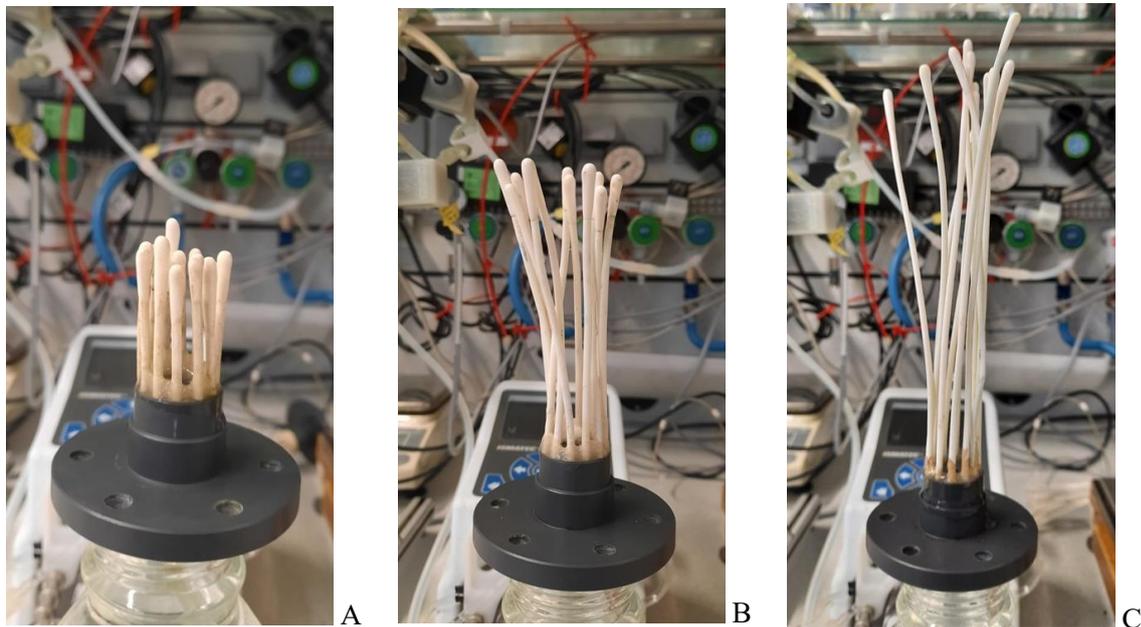


Abbildung 8-4: Eingesetzte Faserhalter (Mini-Faserhalter (A), Midi-Faserhalter (B) und Maxi-Faserhalter (C)) an der Filtrationsanlage *Mini-Harvester*. Die Membranflächen  $A_M$  betragen 17,72 cm<sup>2</sup> (Mini-Faserhalter), 73,51 cm<sup>2</sup> (Midi-Faserhalter) sowie 139,00 cm<sup>2</sup> (Maxi-Faserhalter).

### 8.3.5 Regelparameter *Mini-Harvester*

Regler werden in der einschlägigen Literatur anhand ihres Regelverhaltens in verstärkende, integrierende und differenzierende Regler eingeteilt. Dabei sind die Abkürzungen P für proportional, I für integral und D für differentiell wirkende Regler etabliert. Diese Abkürzungen werden im vorliegenden Kapitel angenommen, um die fachlich anerkannten Termini zu verwenden. Mit Ausnahme dieses Abschnitts ist im sonstigen Text der gesamten Arbeit P als Abkürzung für Phosphor, I als Abkürzung für Lichtintensität definiert.

Zur automatisierten Einstellung eines konstanten Filtrat-Flux an der Filtrationsanlage *Mini-Harvester* wurde ein in das Prozessleitsystem BioProCon integrierter PI-Regler (Proportional-Integral-Regler) angewandt. Für dessen einwandfreien Betrieb mussten dessen Regelparameter (Regelverstärkung  $K_P$  und Nachstellzeit  $T_n$ ) bestimmt werden. Dies geschah nach dem Ziegler-Nichols Verfahren (Ziegler und Nichols 1993). Dabei wird der Integralanteil des Reglers auf null gesetzt. Anschließend wird der Proportionalanteil des Reglers ( $K_P$ ) so weit erhöht, bis das System zu schwingen beginnt. Der zugehörige Wert des Proportionalanteils wird als kritische Regelverstärkung  $K_{P,krit}$  bezeichnet. Im Anschluss wird die Periodendauer der einzelnen Schwingungen arithmetisch gemittelt und so die mittlere Periodendauer  $T_{krit}$  bestimmt. Die optimalen Regelparameter  $K_P$  und  $T_n$  für das vorliegende System können aus den beiden Werten ( $K_{P,krit}$  und  $T_{krit}$ ) gemäß den Gleichungen (8.3) und (8.4) berechnet werden.

$$K_P = 0,45 \cdot K_{P,krit} \quad (8.3)$$

$$T_n = 0,85 \cdot T_{n,krit} \quad (8.4)$$

Die zu regelnde Größe des PI-Reglers am *Mini-Harvester* ist der Filtrat-Flux, entsprechend wurde dessen zeitlicher Verlauf bei einer stufenweisen Erhöhung von  $K_P$  aufgenommen. Abbildung 8-5 zeigt die periodische Schwingung des Filtrat-Fluxes bei Erreichen von  $K_{P,krit} = 26000$ .  $T_{krit}$  wurde zu 1,082 quantifiziert und damit  $K_P$  zu 11700 und  $T_n$  zu 0,919 berechnet.

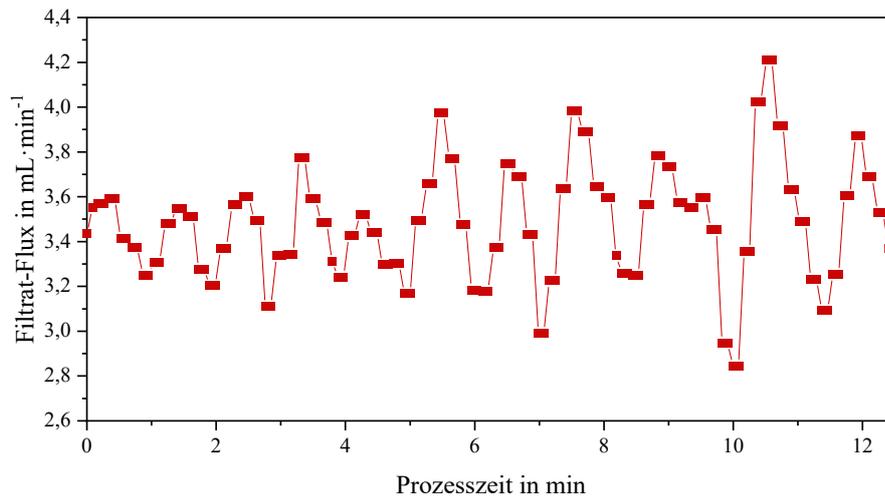


Abbildung 8-5: Ermittlung der kritischen Regelverstärkung  $K_{P,krit}$  des PI-Reglers der Filtrationsanlage *Mini-Harvester* zur Regelung eines konstanten Filtrat-Flux.

## 8.4 Filtrationsexperimente

### 8.4.1 $R_M$ vor Versuchsstart

Vor jedem Filtrationsexperiment mit *Harvester* oder *Mini-Harvester* wurde der Widerstand der sauberen Membran ( $R_M$ ) mit VE-Wasser ermittelt. Vor Versuchsbeginn wurde VE-Wasser bei einem konstanten Druck (*Mini-Harvester*) bzw. Filtrat-Flux (*Harvester*) für mindestens 45 Min filtriert, um die Membran zu konditionieren. Der Membranwiderstand wurde aus den Daten der Filtration der darauffolgenden 15 Minuten bestimmt. Wurden während eines Experimentes verschiedene Ansätze getestet, so fand zwischen diesen jeweils eine mechanische Zwischenreinigung der Membran mit VE-Wasser statt. Im Anschluss an die Reinigung wurde wie beschrieben mit VE-Wasser für 25-30 min filtriert, wobei die letzten 15 min für die Berechnung von  $R_M$  herangezogen wurden.

### 8.4.1.1 Kritischer Flux Experimente

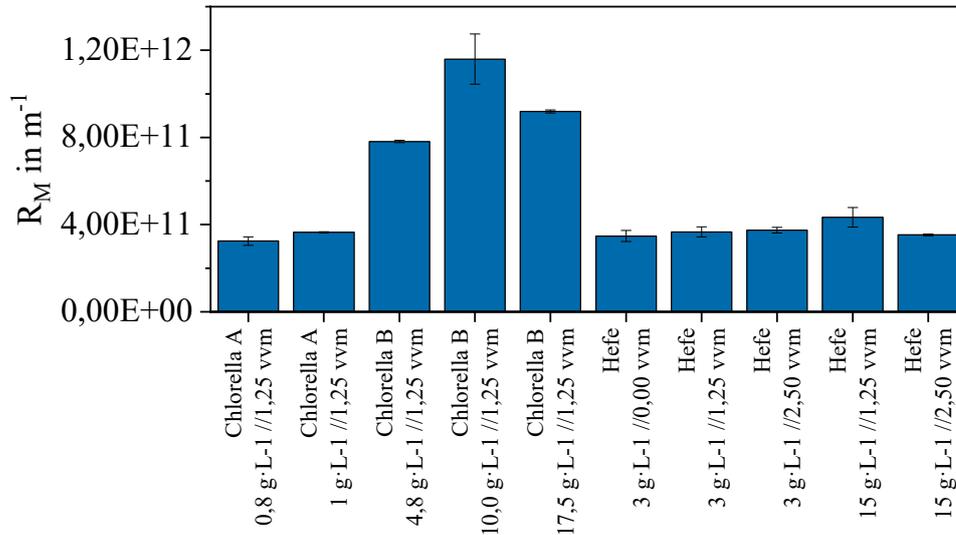


Abbildung 8-6: Membranwiderstand  $R_M$  vor Versuchsstart der Bestimmung des kritischen Flux an der Filtrationsanlage *Harvester*.  $R_M$  wurde während der Filtration von VE-Wasser für 15 min bei einem konstanten Filtrat-Flux von  $\sim 10\text{--}15\text{ L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  (*Chlorella B*) bzw.  $\sim 2\text{ L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  (*Hefe* und *Chlorella A*) ermittelt. Eingesetzt wurde die Modellsuspension Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) sowie die Grünalge *Chlorella vulgaris*. Der kritische Flux wurde bei verschiedenen Belüftungsraten der Membranfasern sowie Biomassekonzentrationen bestimmt.

### 8.4.1.2 Reduktion von Membran-Fouling – Rückspülen

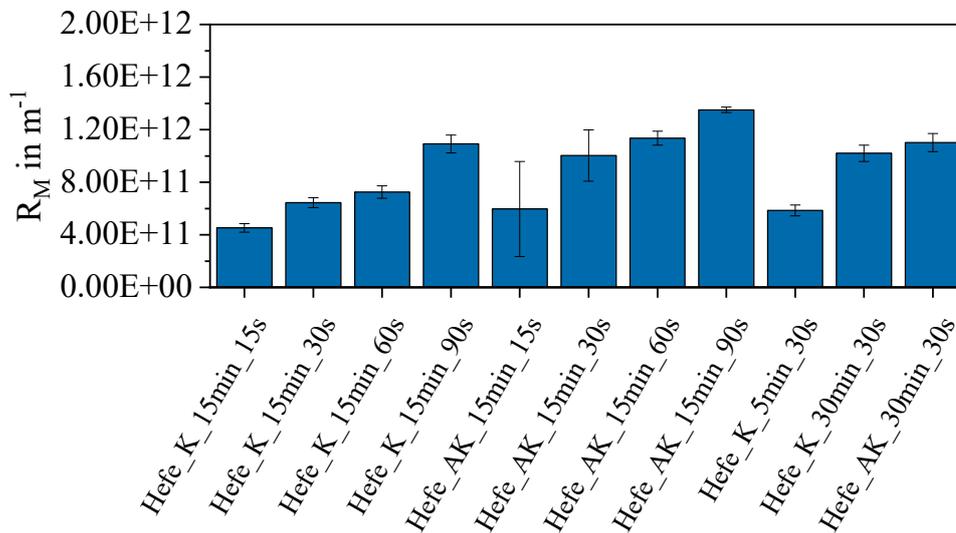


Abbildung 8-7: Membranwiderstand  $R_M$  vor Versuchsstart einer Untersuchung zur Reduktion von Membran-Fouling durch Rückspülen mit einer Hefesuspension an der Filtrationsanlage *Mini-Harvester*.  $R_M$  wurde während der Filtration von VE-Wasser für 15 min bei einem konstanten TMP von  $\sim 223\text{ mbar}$  ermittelt. Im darauffolgenden Experiment wurden folgende Einstellungen bezüglich Rückspülfrequenz (RF) und Rückspüldauer (PD) getestet: RF 15 min, RD 15 s, 30 s, 60 s und 90 s; RF 5 min und 30 min, RD 30 s.

### 8.4.1.3 Reduktion von Membran-Fouling - Pausieren

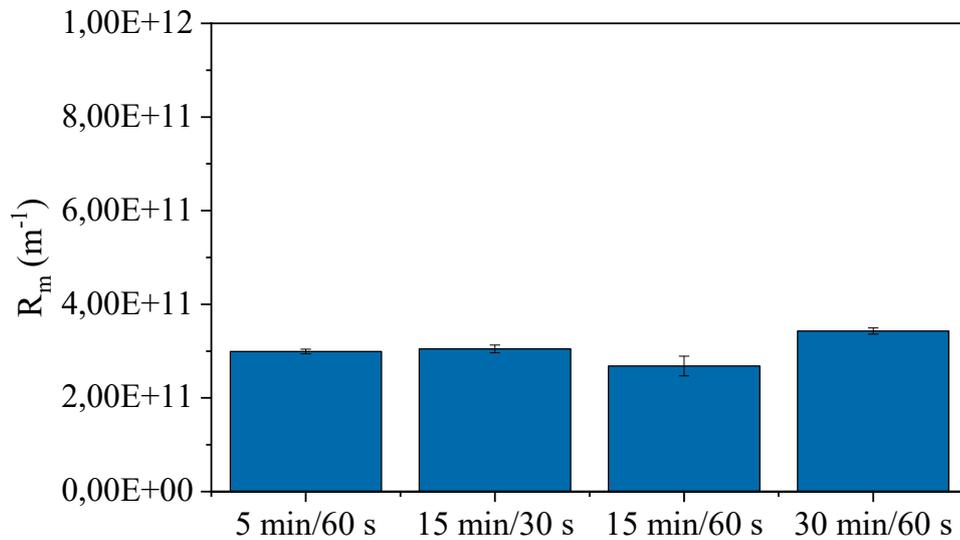


Abbildung 8-8: Membranwiderstand  $R_M$  vor Versuchsstart einer Untersuchung zur Reduktion von Membran-Fouling durch Pausieren mit einer Hefesuspension an der Filtrationsanlage *Harvester*.  $R_M$  wurde während der Filtration von VE-Wasser für 15 min bei einem konstanten Filtrat-Flux von  $\sim 23 \text{ L} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$  ermittelt. Im darauffolgenden Experiment wurden folgende Einstellungen bezüglich Pausierfrequenz (PF) und Pausierdauer (PD) getestet: PF 5 min, PD 60 s; PF 15 min, PD 30 s; PF 15 min, PD 60 s; PF 30 min, PD 60 s.

### 8.4.1.4 Fraktionierte Filtration Algensuspension – Wachstumsphase

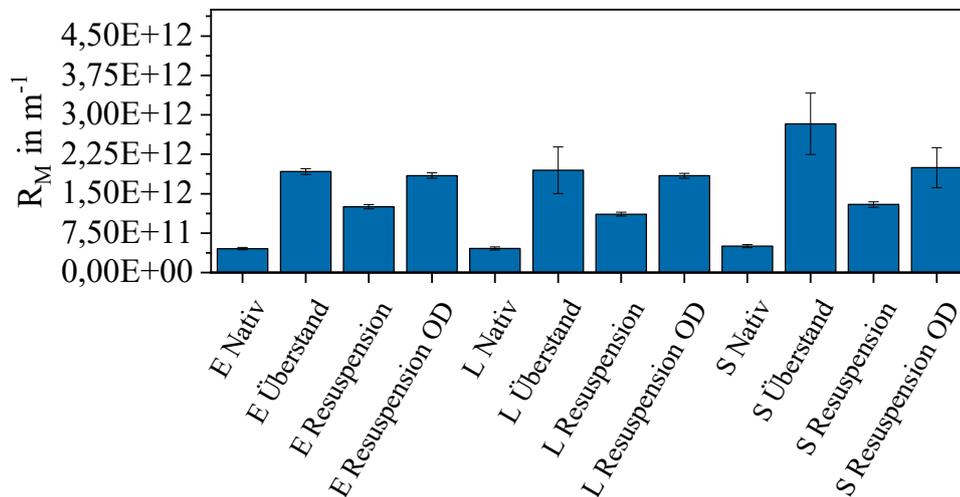


Abbildung 8-9: Membranwiderstand  $R_M$  vor Versuchsstart der fraktionierten Filtration einer *Chlorella vulgaris* Kultur mit der Filtrationsanlage *Mini-Harvester*.  $R_M$  wurde während der Filtration von VE-Wasser für 15 min bei einem konstanten TMP von  $\sim 100 \text{ mbar}$  ermittelt. Im darauffolgenden Experiment wurden die einzelnen Fraktionen einer *C. vulgaris* Kultur verschiedener Wachstumsphasen bei einem konstanten TMP filtriert und das Fouling-Verhalten evaluiert.

### 8.4.1.5 Fraktionierte Filtration Algensuspension – Mikroalgenspezies

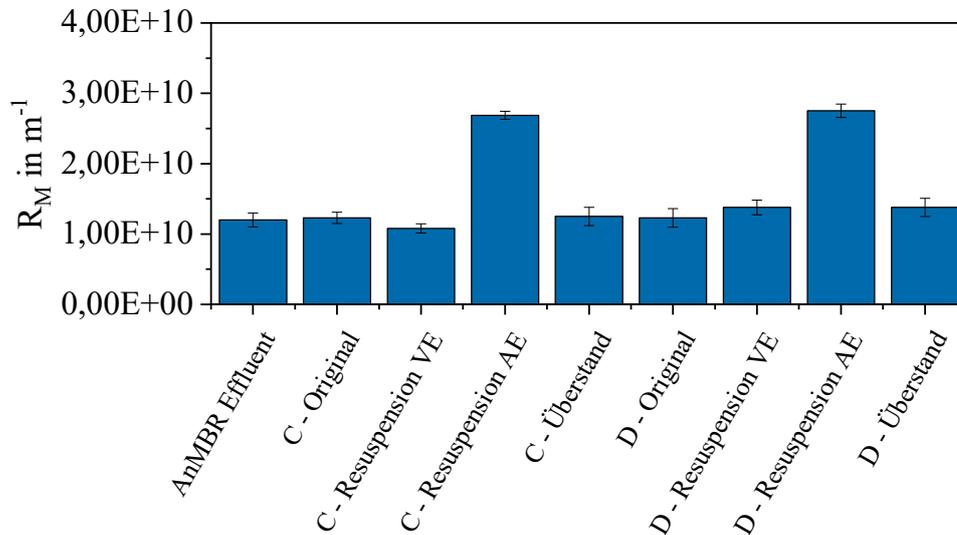


Abbildung 8-10: Membranwiderstand  $R_M$  vor Versuchsstart der fraktionierte Filtration von Mikroalgenkulturen (D: *Desmodesmus* und C: *Coelastrella*) mit der Filtrationsanlage *Mini-Harvester*.  $R_M$  wurde während der Filtration von VE-Wasser für 15 min bei einem konstanten TMP von ~100 mbar ermittelt. Im darauffolgenden Experiment wurden verschiedene Fraktionen (Original: native Suspension, Resuspensionen der Zellen in VE-Wasser (VE) und AnMBR Effluent (AE) sowie zellfreier Überstand und frisches AnMBR Effluent) der Mikroalgenkulturen filtriert und das Fouling-Verhalten evaluiert.

## 8.4.2 Ergänzende Filtrationsdaten

### 8.4.2.1 Membrancharakterisierung - Permeabilität

Tabelle 8-12: Charakterisierung des im *Harvester* eingesetzten Membranmoduls Puron® Hollow Fiber Demo Rows mit VE-Wasser bei verschiedenen Belüftungsraten. (Stabw: Standardabweichung)

Belüftungsrate	Filtrat-Flux	Stabw	TMP	Stabw	$R_m$	Stabw	Pe
vvm	$L \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$	$L \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$	mbar	mbar	$m^{-1}$	$m^{-1}$	$L \cdot m^{-2} \cdot h^{-1} \cdot bar^{-1}$
0,000	5,521	0,012	13,807	0,192	9,805E+11	1,420E+10	399,858
	22,876	0,136	-24,226	0,446	4,152E+11	8,271E+09	944,280
	34,324	0,143	-57,883	0,607	6,612E+11	6,467E+09	592,986
	45,836	0,185	-94,481	0,800	8,118E+11	7,317E+09	485,137
	68,709	0,238	-188,466	1,023	1,082E+12	6,763E+09	364,571
	91,414	0,910	-297,639	1,689	1,288E+12	1,490E+10	307,129

0,625	5,454	0,020	8,625	0,236	6,108E+11	1,755E+10	632,318
	22,899	0,103	-27,897	0,424	4,705E+11	7,331E+09	820,838
	34,361	0,140	-61,492	0,678	6,912E+11	8,283E+09	558,798
	45,809	0,130	-100,101	1,072	8,439E+11	9,284E+09	457,633
	68,689	0,222	-192,583	1,517	1,083E+12	9,875E+09	356,674
	91,641	0,435	-319,125	0,967	1,345E+12	7,170E+09	287,165
1,250	5,624	0,023	7,815	0,223	5,226E+11	1,488E+10	719,694
	22,907	0,088	-34,275	0,464	5,620E+11	8,148E+09	668,314
	34,364	0,113	-67,837	0,836	7,441E+11	8,653E+09	506,564
	45,827	0,149	-107,300	0,732	8,827E+11	6,416E+09	427,092
	68,721	0,214	-206,025	0,977	1,133E+12	6,663E+09	333,556
	91,921	0,512	-319,184	2,189	1,317E+12	6,875E+09	287,986
1,875	5,437	0,019	6,218	0,358	4,338E+11	2,468E+10	874,398
	22,906	0,088	-36,648	0,368	6,056E+11	6,114E+09	625,027
	34,396	0,232	-71,127	0,979	7,824E+11	7,804E+09	483,581
	45,787	0,157	-105,176	0,833	8,618E+11	7,564E+09	435,340
	68,678	0,317	-203,175	0,994	1,110E+12	6,587E+09	338,023
	91,586	0,371	-315,890	1,146	1,298E+12	8,477E+09	289,931
2,500	5,500	0,004	8,668	0,414	5,928E+11	2,770E+10	634,480
	22,909	0,011	-35,303	0,347	5,774E+11	5,572E+09	648,936
	34,339	0,015	-69,531	0,788	7,585E+11	9,230E+09	493,870
	45,831	0,025	-106,669	9,970	8,718E+11	8,165E+10	429,656
	68,719	0,031	-205,979	0,669	1,123E+12	5,240E+09	333,621
	91,658	0,053	-317,740	2,390	1,304E+12	1,022E+10	288,469

## 8.4.2.2 Reduktion von Membran-Fouling – Rückspülen

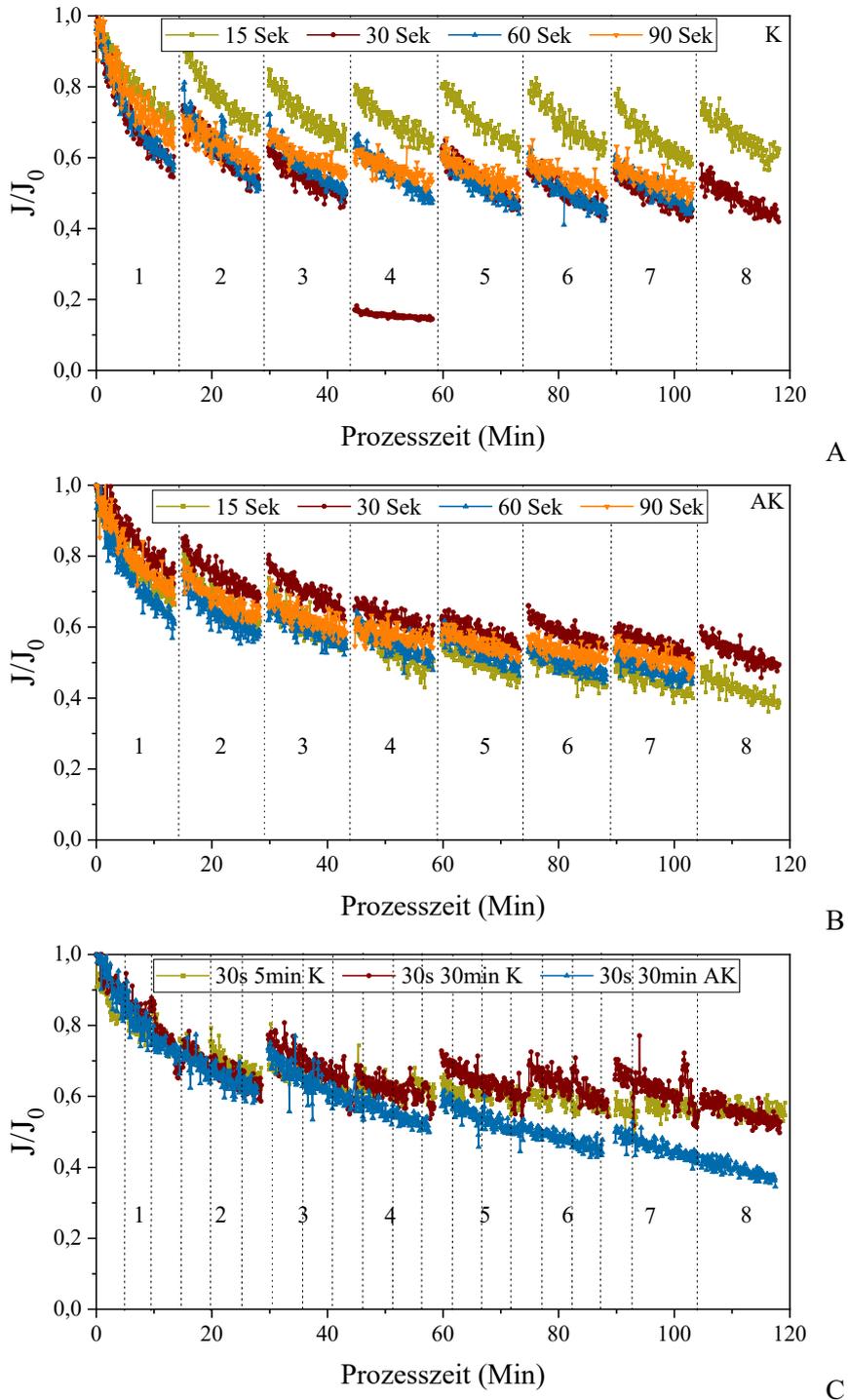


Abbildung 8-11: Normierte Filtrat-Flux-Zeit Profile ( $J/J_0$ ) der Filtration einer Hefesuspension im *Mini-Harvester* zum Test der Effektivität des Rückspülens bei unterschiedlicher Dauer und Frequenz. Retentat und Filtrat wurden in das Vorlagegefäß zurückgeführt (A), oder getrennt in Gefäßen gesammelt (B), wodurch die Biomassekonzentration im *Mini-Harvester* gleichblieb (A) beziehungsweise anstieg (B). Die Membranfasern wurden alle 15 Minuten (A & B) bzw. 5 Minuten oder 30 Minuten (C) bei konstantem Druck (100 mbar) rückgespült. Die Dauer des Rückspülens variierte bei den Ansätzen A und B (15, 30, 60 oder 90 Sekunden) bzw. blieb konstant bei 30 Sekunden in Ansatz C.

## 8.4.2.3 Reduktion von Membran-Fouling – Pausieren

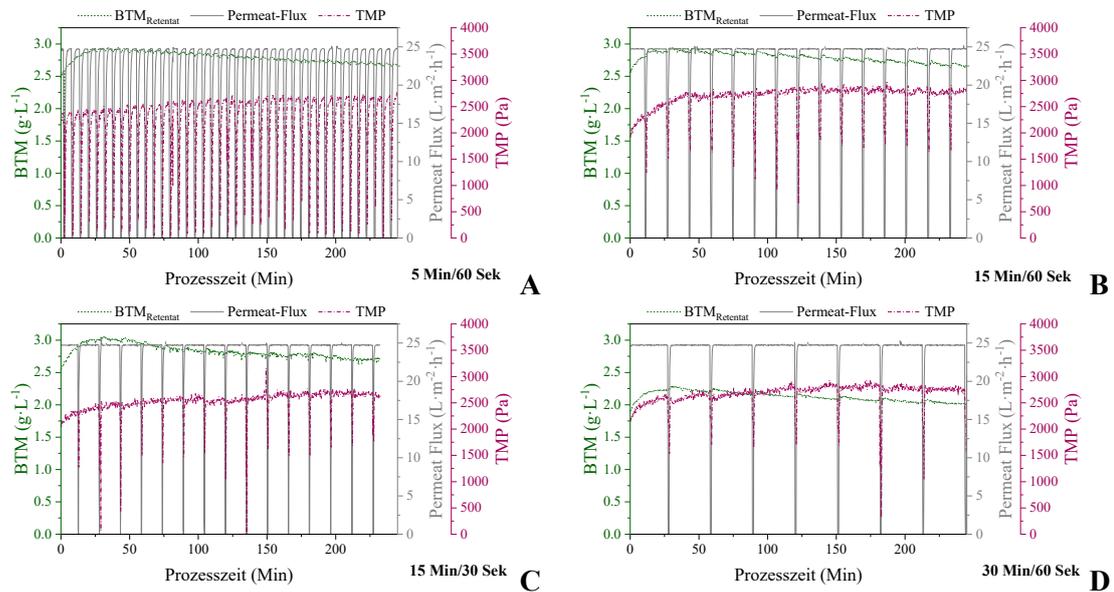
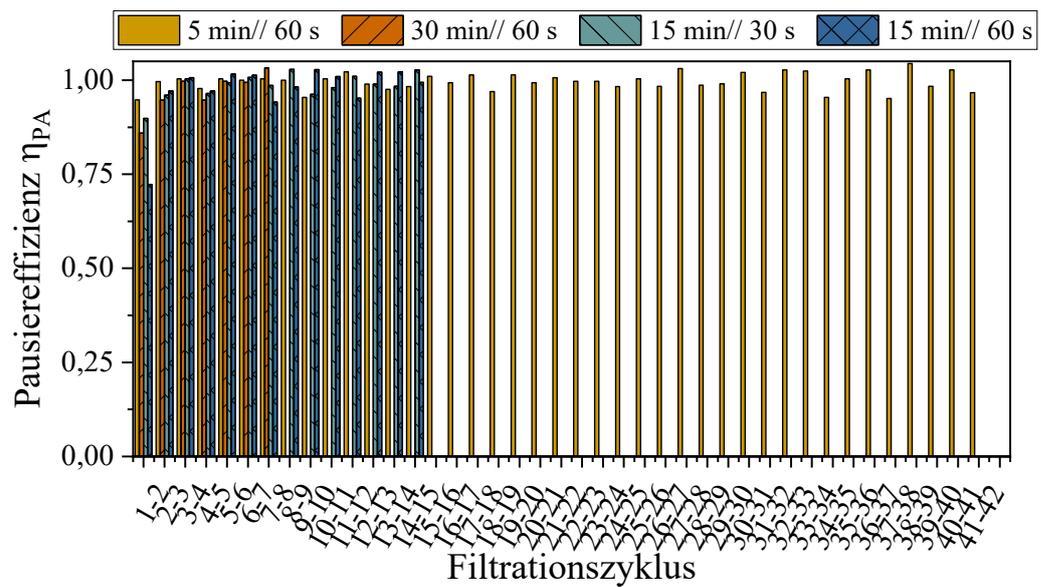
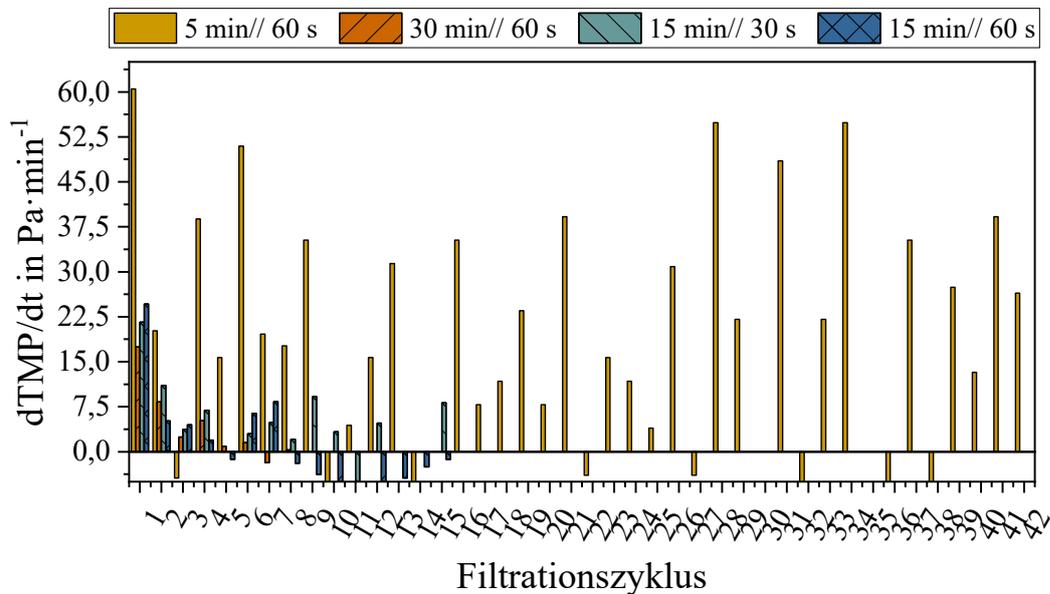


Abbildung 8-12: Permeat-Flux-, TMP- und BTM-Zeit Profile der Untersuchung der Effektivität des Pausierens als Maßnahme gegen Membran-Fouling während der Filtration einer Hefesuspension am *Harvester*. Getestete wurden verschiedene Filtrations- sowie Pausier-Zyklen (A: 5 min/60s, B: 15 min/60 s, C: 15 min/30 s, D: 30 min/60 s).



A



B

Abbildung 8-13: Filtrations- sowie Pausier-Zyklen Pausereffizienz ( $\eta_{PA}$ ) zwischen den Filtrationszyklen (A) sowie TMP-Anstieg innerhalb eines Filtrationszyklus (B) für Evaluation von Dauer und Frequenz des Pausierens (5 min/60 s, 15 min/60 s, 15 min/30 s, 30 min/60 s) als Anti-Fouling Maßnahme mittels einer Hefesuspension ( $3 g \cdot L^{-1}$ ) an der Filtrationsanlage *Harvester*.

#### 8.4.2.4 Kritischer Flux Bestimmung am *Mini-Harvester*

Vor jedem Experiment wurde die Filtrationsanlage *Mini-Harvester* gemäß des Reinigungsprotokolls (Abschnitt 8.3.3) gereinigt und die Membran vor Versuchsstart für 45 min bei einem konstanten Unterdruck von 200 mbar vorbereitet.

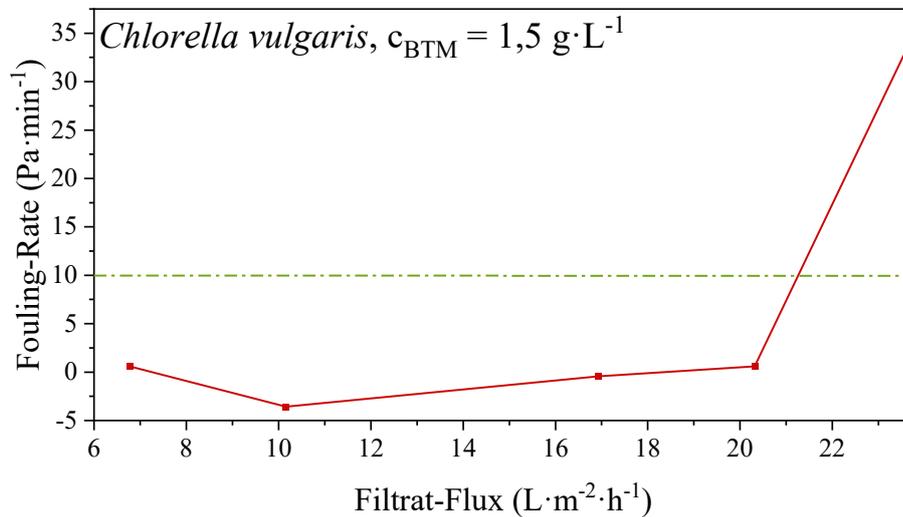


Abbildung 8-14: Ermittlung des kritischen Flux (Flux-Step Methode) der Filtrationsanlage *Mini-Harvester* bei Einsatz des Mini-Faserhalters mittels einer *Chlorella vulgaris* Suspension (1,5 g·L<sup>-1</sup>). Das kritische Flux-Kriterium (Fouling-Rate) wurde auf 10 Pa·min<sup>-1</sup> festgelegt, die Schritthöhe der einzelnen Flux-Schritte betrug 2 L·m<sup>-2</sup>·h<sup>-1</sup>. Zwischen den 10-minütigen Flux-Schritten wurden die Membranfasern für 30 s mit VE-Wasser rückgespült, zudem wurde die Membran permanent belüftet.

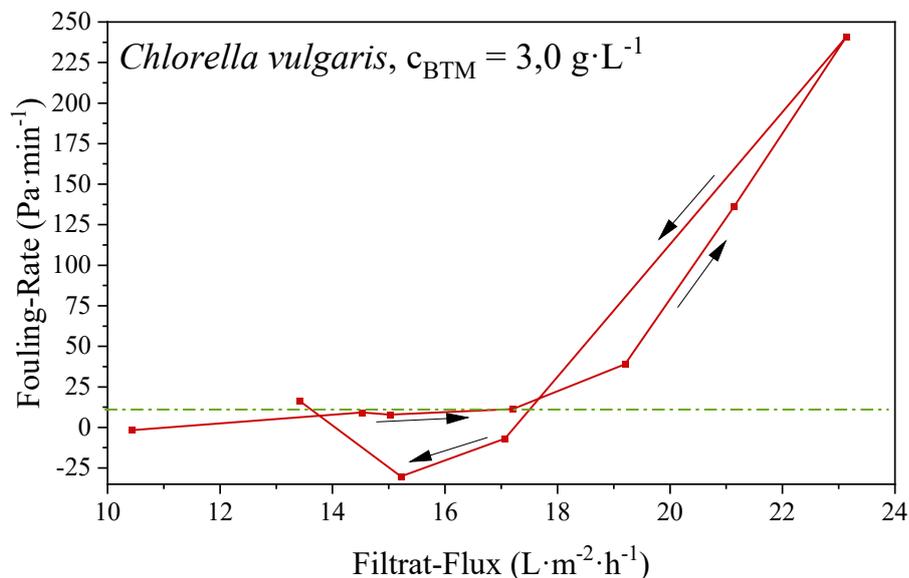


Abbildung 8-15: Ermittlung des kritischen Flux (Flux-Step Methode) der Filtrationsanlage *Mini-Harvester* bei Einsatz des Maxi-Faserhalters mittels einer *Chlorella vulgaris* Suspension (3,0 g·L<sup>-1</sup>). Das kritische Flux-Kriterium (Fouling-Rate) wurde auf 10 Pa·min<sup>-1</sup> festgelegt, die Schritthöhe der einzelnen Flux-Schritte betrug 2 L·m<sup>-2</sup>·h<sup>-1</sup>. Zwischen den 10-minütigen Flux-Schritten wurden die Membranfasern für 60 s mit VE-Wasser rückgespült, zudem wurde die Membran permanent belüftet.

## 8.5 Kultivierungsexperimente

### 8.5.1 Kontinuierliche Kultivierung Hell/Dunkel-Regime – Satzphase

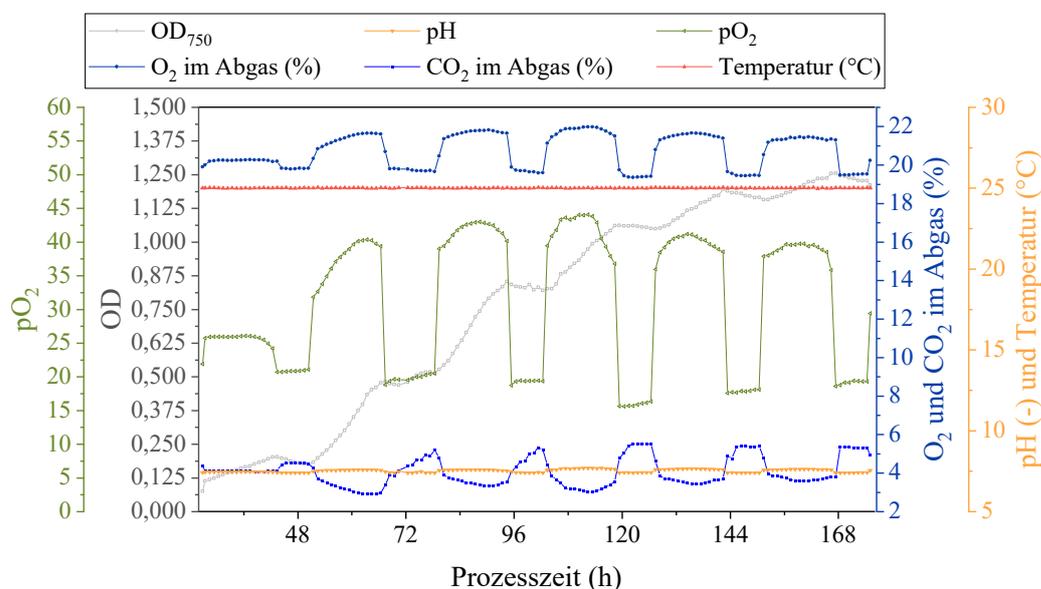


Abbildung 8-16: Prozessparameter (pH, Temperatur, pO<sub>2</sub>, Abgaszusammensetzung (O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub>) sowie Biotrockenmassekonzentration einer Satzkultivierung (D = 0,0 h) von *C. vulgaris* SAG 211-12 in modifiziertem

BG11-Medium bei einem Hell/Dunkel-Regime von 16 h:8 h.

#### Kontinuierliche Kultivierung bei permanenter Beleuchtung

*Chlorella vulgaris* SAG 211-12 wurde in mBG11-Medium (2-fach konzentriert,  $c_{N,Medium,soll} = 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $c_{P,Medium,soll} = 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) bei  $350 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (permanente Beleuchtung),  $25 \text{ } ^\circ\text{C}$ , pH 7,5, und  $95 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  Begasung (5 % CO<sub>2</sub>) kontinuierlich kultiviert. Die Verdünnungsrate wurde im Bereich zwischen  $D = 0,0 \text{ d}^{-1}$  und  $0,5 \text{ d}^{-1}$  in  $0,1 \text{ d}^{-1}$ -Schritten variiert. Die Beprobung des Reaktors erfolgte im Fließgleichgewicht des PBR.

Tabelle 8-13: Ergänzende Kultivierungsdaten einer kontinuierlichen Kultivierung von *C. vulgaris* SAG 211-12 in mBG11-Medium (2-fach) bei permanenter Beleuchtung.

	Verdünnungsrate D					
	0,0 d <sup>-1</sup>	0,1 d <sup>-1</sup>	0,2 d <sup>-1</sup>	0,3 d <sup>-1</sup>	0,4 d <sup>-1</sup>	0,5 d <sup>-1</sup>
$c_{BTM}$ in $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	3,23	3,60	2,96	2,38	1,43	1,01
$OD_{750}$	21,4	21,9	17,5	15	12,7	10,6

Bis zu einer Verdünnungsrate von  $D = 0,4 \text{ d}^{-1}$  wurden sowohl Stickstoff als auch Phosphor vollständig aus dem Medium aufgenommen, sodass beide Nährstoffe im Reaktorausfluss nicht mehr nachweisbar waren. Bei einer Verdünnungsrate von  $D = 0,5 \text{ d}^{-1}$  waren  $55 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) im Reaktorausfluss messbar.

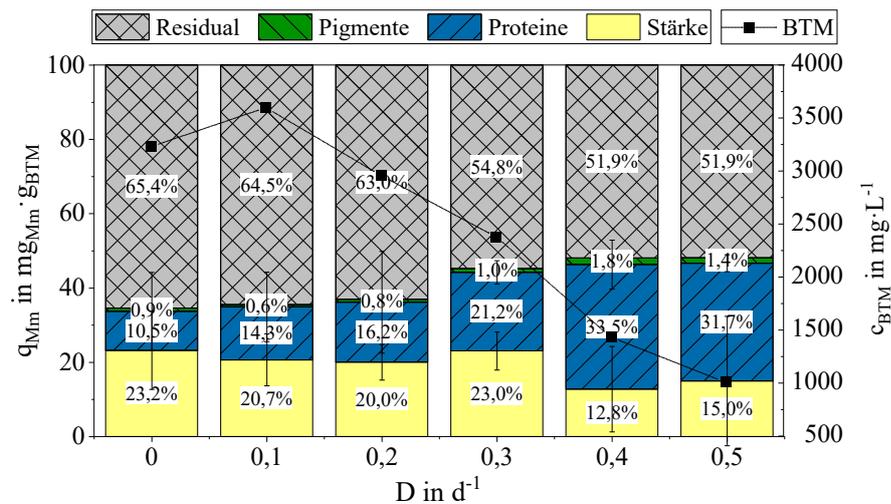


Abbildung 8-17: Makromolekulare Zusammensetzung und Biotrockenmassekonzentration einer kontinuierlichen Kultivierung von *C. vulgaris* SAG 211-12 bei permanenter Beleuchtung in modifiziertem BG11-Medium. Die Verdünnungsrate wurde im Bereich zwischen  $D = 0,0 \text{ d}^{-1}$  und  $0,5 \text{ d}^{-1}$  in  $0,1 \text{ d}^{-1}$ -Schritten variiert.

### 8.5.3 Kontinuierliche Kultivierung mit Zellrückführung bei permanenter Beleuchtung

*Chlorella vulgaris* SAG 211-12 wurde in mBG11-Medium (4-fach konzentriert, gemessene Konzentrationen:  $c_{N, \text{Medium}} = 190 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $c_{P, \text{Medium}} = 35 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) bei  $350 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (permanente Beleuchtung),  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 7,5, und  $95 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  Begasung (5 %  $\text{CO}_2$ ) kontinuierlich kultiviert. Eine Zellrückführung erfolgte durch Rückführung von Retentat aus dem *Mini-Harvester*. Die Beprobung des Reaktors erfolgte im Fließgleichgewicht des MPBR. Eine Messung des Protein-gehaltes konnte aufgrund mangelnder Probenmenge nicht erfolgen.

Tabelle 8-14: Erganzende Kultivierungsdaten einer kontinuierlichen Kultivierung mit Zellruckfuhrung von *C. vulgaris* SAG 211-12 in mBG11-Medium (4-fach) bei permanenter Beleuchtung.

	$D = 0,4 \text{ d}^{-1}$	$D = 0,5 \text{ d}^{-1}$
$c_{BTM} \text{ in } \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	3,4	2,5
$OD_{750}$	18,9	15,9
$q_{\text{Kohlehydrate, BTM}} \text{ in } \%_{BTM}$	20,53	19,86
$q_{\text{Pigmente, BTM}} \text{ in } \%_{BTM}$	4,73	6,45
$c_{N, \text{residual}} \text{ in } \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	0,0	0,0
$c_{P, \text{residual}} \text{ in } \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	11	21

### 8.5.4 Satzbetrieb und kontinuierliche Kultivierung mit anschließender Zellrückführung in Dunkelphase

*Chlorella vulgaris* SAG 211-12 wurde in mBG11-Medium (4-fach konzentriert,  $c_{N, \text{Medium, soll}} = 200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $c_{P, \text{Medium, soll}} = 40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) bei  $350 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (permanente Beleuchtung),  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 7,5, und  $95 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  Begasung (5 %  $\text{CO}_2$ ) kultiviert. Der kontinuierlichen

Kultivierung ging eine Satzphase voraus. Nach Erreichen eines Fließgleichgewichts der kontinuierlichen Phase wurde die Zellrückführung gestartet.

Ergänzende Kultivierungsdaten Satzphase

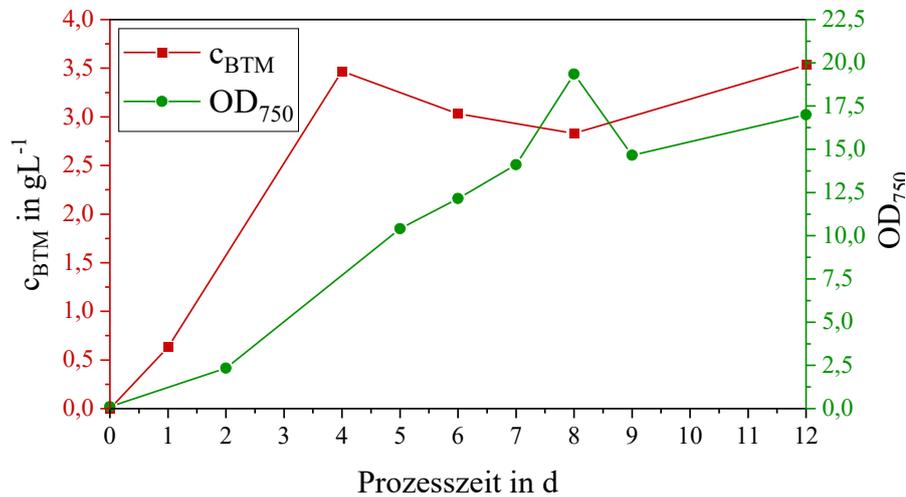


Abbildung 8-18: Biotrockenmassekonzentration und optische Dichte ( $\text{OD}_{750}$ ) einer Satzkultivierung von *C. vulgaris* SAG 211-12 bei permanenter Beleuchtung in modifiziertem BG11-Medium.

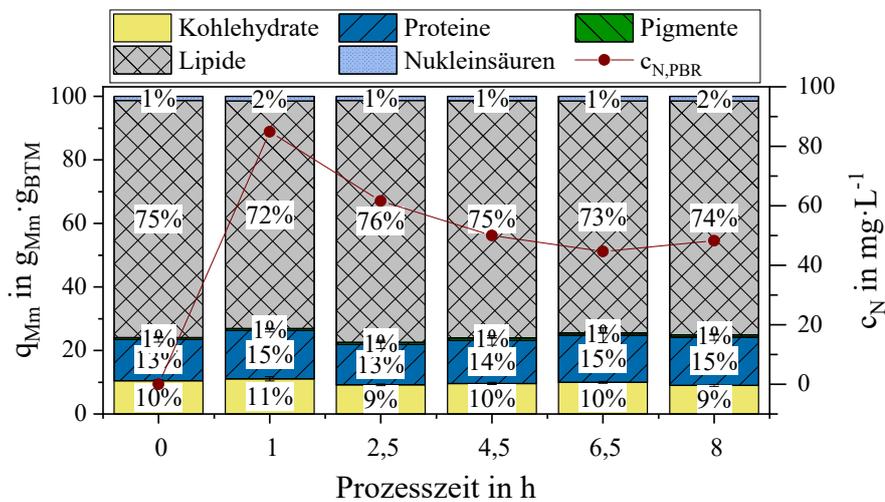


Abbildung 8-19: Makromolekulare Zusammensetzung einer Satzkultivierung von *C. vulgaris* SAG 211-12 bei permanenter Beleuchtung nach Zugabe von Stickstoff in den PBR ( $c_{\text{N,PBR,gemessen}} = 84,90 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

## 8.6 Modelle und Simulation

### 8.6.1 Stationäres metabolisches Fluss-Modell des Mikroalgenstoffwechsels

Eine Algenzelle kann im weitesten Sinne als „zelluläres System“ beschrieben werden, einem Netzwerk an miteinander interagierenden Komponenten mit Vorwärts- und Rückkopplungsschleifen. Die Bildung vereinfachender Modelle dieser Abläufe erlaubt eine mathematische Beschreibung des Prozesses „Zelle“ auf Basis biochemischer Reaktionsnetzwerke. Zur Unterstützung der Auswertung und Interpretation der experimentellen Messdaten wurden die Stoffwechselaktivitäten einer Mikroalgenzelle daher in einem vereinfachenden generischen Modell abgebildet.

Als Instrumente zur Beschreibung der Zusammenhänge innerhalb der Zelle sowie zwischen Zelle und Umwelt dienen Stoffströme (Abbildung 8-20), welche durch spezifische Raten  $r$  abgebildet werden. Die Reaktion der Mikroalgenzelle auf die umgebenden Umweltbedingungen bzw. deren Veränderungen werden durch Kinetiken beschrieben, welche die Geschwindigkeit biochemischer Prozesse wie die Aufnahme von Komponenten in die Zelle abbilden. Intrazelluläre Stoffströme repräsentieren metabolische Aktivitäten und stehen über die Stöchiometrie der Zelle sowie energetische Betrachtungen in Beziehung zueinander. Ein auf dem Modell der Stoffströme basierendes Reaktormodell ermittelt die Lichtgradienten in einem Flachplatten-Photobioreaktor. Dieses berechnet die spezifischen Wachstumsraten, die damit verbundenen Einschränkungen und Biomassekonzentrationen unter Verwendung allgemeiner technischer Material- und Energiebilanzen.

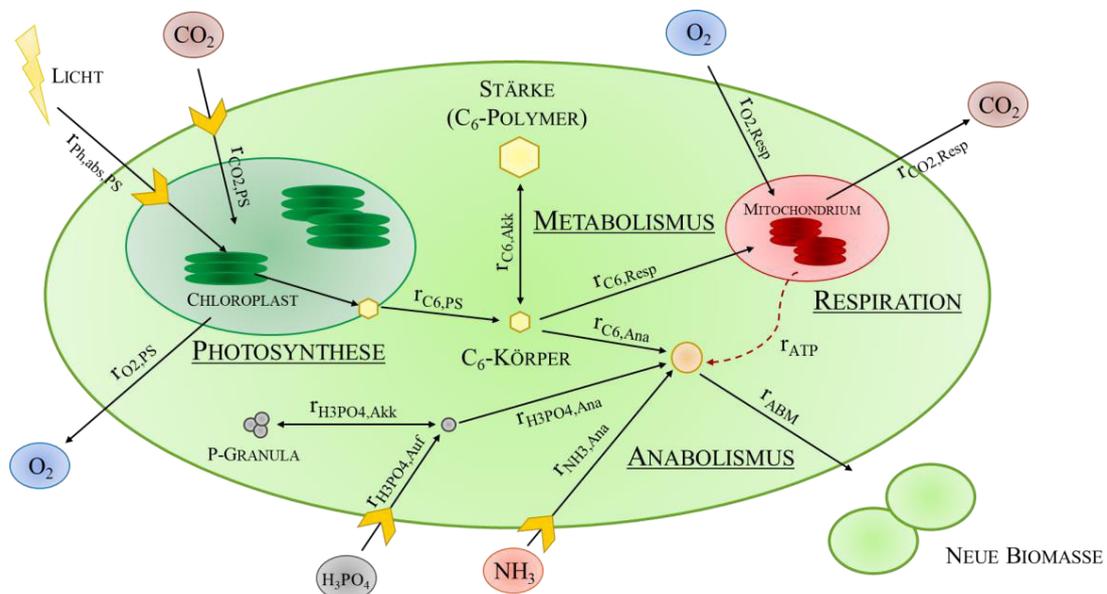


Abbildung 8-20: Vereinfachtes Modell des Mikroalgen Stoffwechsels, welches drei Knoten umfasst: Photosynthese, Atmung und Anabolismus. Stoffwechselaktivitäten werden durch spezifische Raten  $r$  abgebildet (PS – Photosynthese, Ph – Photon, abs – absorbiert, Akk – Akkumulation, Resp – Respiration (Atmung), Ana – Anabolismus, BM – Biomasse, ABM – aktive Biomasse).

Das gezeigte Flussmodell basiert auf den in Kliphuis et al. 2012 und Blanken et al. 2016 formulierten Stoffwechsel-Modellen sowie den in Schediwy et al. 2019 dargestellten Kinetiken. Zur Auswertung der im Zuge der vorliegenden Arbeit erzeugten Kultivierungsdaten wurde das Modell mit der Dynamik der Speicherbildung von Mikroalgen erweitert. Intrazelluläre Speicher umfassen dabei die Ansammlung von Phosphor-Granula in der Zelle sowie den Aufbau von Stärke bei Nährstofflimitierung.

Das Flussmodell umfasst die drei Stoffwechselknoten *Photosynthese* (PS), *Atmung* oder *Respiration* (Resp) und *Anabolismus* (Ana). *Respiration* und *Anabolismus* können im *Metabolismus* zusammengefasst werden. Die einzelnen Knoten sind über Metabolit- oder Energieflüsse miteinander verbunden, die als Vektoren mit spezifischen Umsatzraten  $r$  und einer stöchiometrischen Matrix  $Y$  angegeben werden. In den folgenden Abschnitten werden Gleichungen nach der Netzwerktheorie entwickelt.

Im Stoffwechselknoten *Photosynthese* werden die spezifische Photonabsorption ( $r_{\text{Ph,abs,PS}}$ ), Aufnahme von  $\text{CO}_2$  ( $r_{\text{CO}_2,\text{PS}}$ ) sowie die Bildung von  $\text{O}_2$  ( $r_{\text{O}_2,\text{PS}}$ ) und eines energiereichen  $\text{C}_6$ -Körpers ( $r_{\text{C}_6,\text{PS}}$ ) betrachtet. Die Akkumulation von Stärke als Polymer des aus der *Photosynthese* stammenden  $\text{C}_6$ -Körpers wird über die Rate  $r_{\text{C}_6,\text{Akk}}$  abgebildet. Die *Atmung* berücksichtigt die Respiration des  $\text{C}_6$ -Körpers ( $r_{\text{C}_6,\text{Resp}}$ ) unter der Bildung von  $\text{CO}_2$  ( $r_{\text{CO}_2,\text{Resp}}$ ) sowie der die Aufnahme von  $\text{O}_2$  ( $r_{\text{O}_2,\text{Resp}}$ ) zur Generierung von ATP ( $r_{\text{ATP}}$ ). Der ATP-Strom verknüpft die *Respiration* mit dem *Anabolismus*. Der Aufbau neuer Biomasse schließt zudem die Bereitstellung von Kohlenstoffgerüsten ( $r_{\text{C}_6,\text{Ana}}$ ) sowie Nährstoffen ein, letztere repräsentiert durch die Stickstoffaufnahme ( $r_{\text{NH}_3,\text{Ana}}$ ) sowie die intrazellulären Phosphorbereitstellung ( $r_{\text{H}_3\text{PO}_4,\text{Ana}}$ ). Nach der Phosphataufnahme aus dem Medium ( $r_{\text{H}_3\text{PO}_4,\text{Auf}}$ ) ist dessen Verteilung in der Zelle zwischen Speicherung ( $r_{\text{H}_3\text{PO}_4,\text{Akk}}$ ) und Einsatz im *Anabolismus* differenziert. Die im *Anabolismus* gebildete neue Biomasse wächst mit der Wachstumsrate  $r_{\text{ABM}}$ .

Während der *Photosynthese* wird die Lichtenergie in Form eines energiereichen  $\text{C}_3$ -Körpers im Chloroplasten in chemische Energie umgewandelt und als  $\text{C}_6$ -Körper (vereinfacht: Glucose) an das Cytoplasma abgegeben. Nach dem Energiefluss folgt als erster – möglicherweise limitierender – Schritt die Lichtabsorption durch die lichtsammelnden Chlorophyllmoleküle.

$$r_{\text{Ph,PS,abs}} = \sigma_{\text{Ph,BM}} \cdot \text{PFD}_{\text{PAR}} \quad (8.5)$$

Ein zweiter möglicherweise limitierender Schritt während der *Photosynthese* ist die Kohlendioxidaufnahme (Gleichung (8.6)), welche in technischen Kultivierungen in der Regel allerdings vermieden wird. Sie wird oftmals als Michaelis-Menten-Kinetik dargestellt. Da das an der Kohlenstofffixierung beteiligte RuBisCo in der Algenzelle stark überexprimiert wird, um auch bei niedrigen Kohlendioxidkonzentrationen effizient zu sein, ist die  $\text{CO}_2$ -Aufnahme besser durch eine Blackman-Kinetik beschrieben. (BLACKMAN 1905; Schediwy et al. 2019) Im Falle einer Lichtlimitierung ist das Kleiner-als-Zeichen aktiv.

$$r_{\text{CO}_2} \leq \min \left( k_{\text{CO}_2} \cdot c_{\text{CO}_2}, r_{\text{CO}_2,\text{max}} \right) \quad (8.6)$$

Alle vier Flüsse im *Photosynthese* Knoten sind durch stöchiometrische Beziehungen bezüglich des Verhältnisses der gebildeten/aufgenommenen Kohlenstoff zu Sauerstoff und des photosyn-

thetischen Ausbeutekoeffizienten  $y_{C_6,Ph}$  gekoppelt (Gleichung (8.7)), wobei die Netto-Bildung aus Elektronentransportkette und Calvin-Zyklus betrachtet wird.

$$Y_{PS} \cdot r_{PS} = \begin{bmatrix} M_{CO_2}^{-1} & M_{O_2}^{-1} & 0 & 0 \\ 6 \cdot M_{CO_2}^{-1} & 0 & 0 & -M_{C_6}^{-1} \\ 0 & 0 & y_{C_6,Ph} & -M_{C_6}^{-1} \end{bmatrix} \cdot [r_{CO_2,PS}, r_{O_2,PS}, r_{Ph,PS,abs}, r_{C_6,PS}]^T = 0 \quad (8.7)$$

Im *Metabolismus* sind die beiden Stärke konsumierenden Hauptmechanismen *Atmung* und *Anabolismus* berücksichtigt. Die Aufteilung des Kohlenstoffflusses findet im Tricarbonsäurezyklus (TCC) statt. Die hier betrachteten Ströme sind durch die bei der *Atmung* als ATP erzeugte Energie und den Energiebedarf des Wachstums direkt gekoppelt.

$$Y_{Meta} \cdot r_{Meta} = \begin{bmatrix} 1 & 1 & -1 & -1 \\ 0 & 0 & -1/(1-y_{Ana,C_6}) & 1/y_{Ana,C_6} \end{bmatrix} \cdot [r_{C_6,PS}, r_{C_6,Akk}, r_{C_6,Resp}, r_{C_6,Ana}]^T = 0 \quad (8.8)$$

Der für das Wachstum eingesetzte Stärkeanteil  $y_{Ana,C_6}$  beträgt dabei etwa 0,6 und ist damit etwas höher als bei heterotrophen Organismen, da die Vorstufen einiger Makromoleküle direkt von den Chloroplasten geliefert werden. Die energetische Kopplung von *Atmung* und *Anabolismus* ist der Grund für den konstanten Ertragskoeffizienten.

Die Akkumulation von Stärke als Polymer des  $C_6$ -Körpers findet statt, wenn der Verbrauch des  $C_6$ -Körpers für *Atmung* und *Anabolismus* langsamer abläuft als seine Synthese in der *Photosynthese* (Gleichung (8.9)). Umgekehrt wird die Stärke aus dem Speicher bei ungünstigen Lichtbedingungen (temporär oder Nacht) eingesetzt (vgl. Kapitel 4.1). Diese Prozesse werden in der Regel nicht in mathematische Modelle einbezogen, sind aber wichtig, um die täglichen Wachstumszyklen zu verstehen.

$$r_{C_6,Akk} = r_{C_6,PS} - r_{C_6,Resp} - r_{C_6,Ana} \quad (8.9)$$

Dementsprechend kann die *Atmung* in den Mitochondrien folgendermaßen beschrieben werden:

$$Y_{Resp} \cdot r_{Resp} = \begin{bmatrix} 0 & M_{O_2}^{-1} & -M_{CO_2}^{-1} \\ 1 & 1 & -1 \end{bmatrix} \cdot [r_{C_6,Resp}, r_{O_2,Resp}, r_{CO_2,Resp}]^T = 0 \quad (8.10)$$

Aktive Biomasse (nach Bernard et al. 2016) wird im *Anabolismus* aus dem metabolischen Kohlenstofffluss unter Einbindung von Nährstoffen aufgebaut, wobei an dieser Stelle lediglich Stickstoff und Phosphat betrachtet werden.

$$r_{NH_3,Ana} \leq \min \left( k_{NH_3} \cdot c_{NH_3}, r_{NH_3,max} \right) \quad (8.11)$$

$$r_{H_3PO_4,Auf} \leq \min \left( k_{H_3PO_4} \cdot c_{H_3PO_4}, r_{H_3PO_4,max} \right) \quad (8.12)$$

Das Kleiner-als-Zeichen zeigt an, dass die Nährstoffaufnahme als Minimalwert zweier Ereignisse beschrieben wird: der maximalen Rate entsprechend der Kinetik ( $r_{NH_3,max}$  bzw.  $r_{H_3PO_4,max}$ ) oder aber einer darunter liegenden Rate, welchen den aktuellen intrazellulären Bedarf widerspiegelt. Dieser entspricht nach dem klassischen Ansatz dem Stickstoff- und Phosphatgehalt der aktiven Biomasse mit den elementaren Massenanteilen  $e_{P,ABM}$  und  $e_{N,ABM}$ , die direkt aus der empirischen

Formel einer theoretischen *Chlorella* Zelle (aktive Biomasse) abgeleitet werden können (siehe Tabelle 8-15).

Tabelle 8-15: Massenanteile der Elemente ( $e_{E,ABM}$ ) C, O, N, H, P und S sowie eine empirische Formel einer *Chlorella* Zelle (aktive Biomasse). Quelle: Safi et al. 2014.

Massenanteile $e_{E,ABM}$ ( $g \cdot g^{-1}$ )						Empirische Formel <i>Chlorella</i> mit stöchiometrischen Koeffizienten $\nu_E$ [-]; $\nu_C = 1$
C	O	N	H	P	S	
0,545	0,282	0,095	0,064	0,010	0,002	$CH_{1,4}O_{0,39}N_{0,15}P_{0,007}S_{0,002}$

Einige Mikroalgenpezies sind in der Lage, für das Wachstum überschüssiges Phosphat in die Zelle aufzunehmen und dieses in Form von Polyphosphat (PP) zu speichern. Dadurch kann der Phosphatgehalt einer Mikroalgenzelle den normalen Bedarf übersteigen. Aus diesem Grund wird an dieser Stelle zwischen der eigentlichen Phosphataufnahmerate ( $r_{H_3PO_4,Auf}$ ) und der tatsächlichen Umsatzrate im *Anabolismus* ( $r_{H_3PO_4,Ana}$ ) unterschieden, wodurch folgende Bilanzierung möglich wird:

$$r_{H_3PO_4,Akk} = r_{H_3PO_4,Auf} - r_{H_3PO_4,Ana} \quad (8.13)$$

Die Gesamtmassenbilanz inklusive der stöchiometrischen Beziehungen (vermittelt durch die Zusammensetzung der Biomasse  $e_{E,ABM}$ ) kann wie folgt beschrieben werden:

$$Y_{Ana} \cdot r_{Ana} = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 & -1 \\ 0 & M_P/M_{H_3PO_4} & 0 & -e_{P,ABM} \\ 0 & 0 & M_N/M_{NH_3} & -e_{N,ABM} \end{bmatrix} \cdot [r_{C_6,Ana}, r_{H_3PO_4,Ana}, r_{NH_3,Ana}, r_{ABM}]^T = 0 \quad (8.14)$$

Dabei entspricht  $r_{ABM}$  der spezifischen Wachstumsrate.

Das bisherige Modell reicht noch nicht für eine vollständige Beschreibung aller Stoffflüsse aus. Insbesondere können die drei kinetischen Aufnahmeraten sowie die Photosynthese nicht gleichzeitig bei ihrem Maximum liegen. An dieser Stelle wird davon ausgegangen, dass die Zelle ihren Stoffwechsel so reguliert, dass sie die maximale spezifische Wachstumsrate erreicht, die unter den aktuellen Umweltbedingungen möglich ist. Um die stöchiometrischen Bedingungen zu erfüllen, müssen entsprechend einige Aufnahmeraten herunterreguliert werden. Dies bedeutet auch, dass die Speicher nur dann beladen werden, wenn tatsächlich ein Überschuss vorhanden ist. Daraus ergibt sich das lineare Optimierungskriterium:

$$J_X = \max \{r_{ABM}(r) \mid r \cdot Y = 0, r_{max} > r > 0\} \quad (8.15)$$

Nach der linearen Programmierung wird dieses Optimum in jedem Fall auf einem der Ränder (Extrema) der möglichen Kinetiken erreicht. Damit wird das Optimierungsproblem zu einer einfachen Vergleichsaufgabe.

$$r_{ABM} = \min \left\{ \sigma_{Ph,ABM} \cdot y_{ABM,Ph} \cdot PFD_{PAR}, r_{ABM,max}, y_{ABM,N} \cdot r_N \right\} \quad (8.16)$$

Nur die geringste Wachstumsrate ist möglich, alle anderen formalen Lösungen würden die Rahmenbedingungen verletzen.

Abbildung 8-21 zeigt die Simulation der spezifischen Wachstumsrate als Funktion der auf die Photobioreaktoroberfläche auftreffende Lichtintensität sowie der Biomassekonzentration im Reaktor. Lediglich für hohe Lichtverfügbarkeit und geringe Zelldichten kann der maximale Wert der Wachstumsrate erreicht werden.

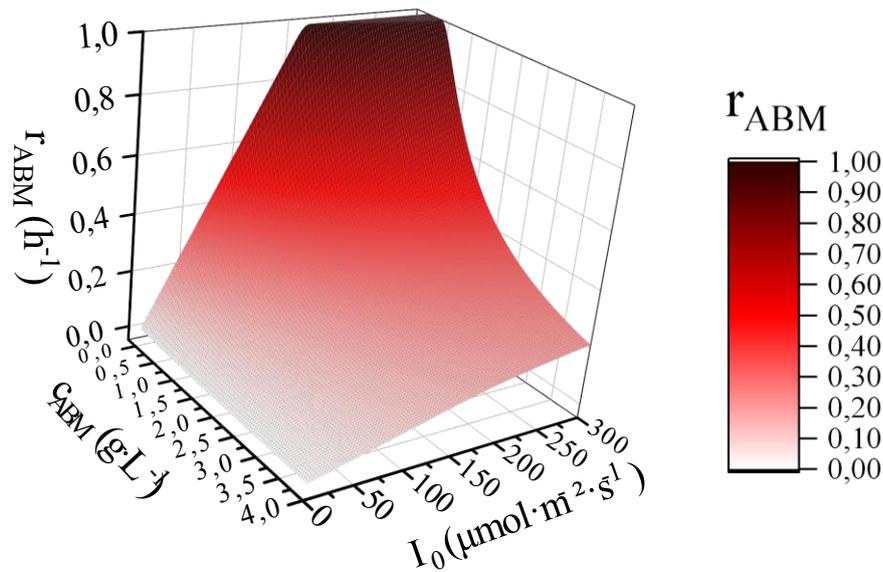


Abbildung 8-21: Simulation der scheinbaren spezifischen Wachstumsrate  $r_{ABM}$  (Mittelwert) als Funktion der Lichtintensität  $I_0$  und Biomassekonzentration  $c_{ABM}$  in einem idealen Photobioreaktor.

## 8.6.2 Physiologische Zustände und makromolekulare Zellzusammensetzung

Die Kombinationen aus aktiven oder heruntergeregelten Kinetiken werden als Modi des Stoffwechsels bezeichnet. Eine Lichtlimitierung – wie sie häufig im Bereich der Mikroalgenkultivierung auftritt – kann durch niedrige Lichtintensitäten oder aber hohe Biomassekonzentrationen verursacht werden. Beides resultiert in einer geringen spezifischen Photonenvfügbarkeit. In diesem Fall wird das gesamte absorbierte Licht vollständig für die Kohlenstofffixierung eingesetzt und die aus der Photosynthese stammenden Kohlenstoffgerüste direkt verstoffwechselt, ohne sich in Form von Stärke als Energiespeicher anreichern zu können. Die  $CO_2$ -Aufnahme wird entsprechend der Menge der verfügbaren Elektronen aus der Photosynthese determiniert. Die spezifische Wachstumsrate hängt proportional von den absorbierten Photonen ab. Überschreitet die Lichtintensität einen Schwellenwert, kann entsprechend der intrazellulären Limitierung durch die maximale spezifische Wachstumsrate  $r_{ABM,max}$  keine weitere Steigerung des Wachstums erfolgen, wodurch überschüssiges Licht verloren geht. Während der Lichtlimitierung müssen die Nährstoffkonzentrationen hoch genug sein, um die für die entsprechende Wachstumsrate erforderliche Aufnahme zu ermöglichen.

Eine Kohlenstofflimitierung ist in der Natur und insbesondere bei in aquatischen Systemen vorkommenden Mikroalgen der Normalzustand. Die Wachstumsrate wird daher oft nicht durch die Lichtverfügbarkeit, sondern durch die CO<sub>2</sub>-Konzentration determiniert. Überschüssiges Licht wird absorbiert, dann aber physikalisch (Fluoreszenz) oder chemisch (NPQ) dissipiert. Dieser technisch ineffiziente Zustand kann im Photobioreaktor durch Begasung mit CO<sub>2</sub>-angereichertem Gas (>5 % CO<sub>2</sub>) vermieden werden.

Im Falle einer Nährstofflimitierung kann die dadurch reduzierte Aufnahme von N und P lediglich geringe Wachstumsraten realisieren, während bezüglich der Lichtabsorption eigentlich höhere Wachstumsraten möglich wären. Die überschüssige Energie wird dann zur Stärkeakkumulation verwendet. Bei diesem Stoffwechselmodus spielt neben der Verfügbarkeit auch das Verhältnis von N und P eine Rolle. Die Nährstoffe sind in der aktiven Biomasse in einem festen stöchiometrischen Verhältnis enthalten (vgl. Abschnitt 1.3.1.5). Ist mehr P als N vorhanden, so bestimmt die geringere N-Verfügbarkeit die Wachstumsrate, während eine Akkumulation von P stattfindet.

Die anabolen Aktivitäten umfassen den Aufbau der wichtigsten zellulären Bestandteile einer Mikroalgenzelle: Proteine, Nukleinsäuren, Kohlenhydrate und Lipide, welche als makromolekulare Zusammensetzung definiert sind. Kohlenhydrate können als strukturelle Kohlenhydrate in der Zellwand vorhanden sein, während ungesättigte Lipide hauptsächlich Bestandteile der Zellmembran sind. Darüber hinaus bilden Stärkekörnchen und Lipidtröpfchen kohlenstoffreiche Energiespeicher. Das Wechselspiel zwischen den verschiedenen Limitierungsmodi und den jeweiligen Aufnahmeraten beeinflusst die makromolekulare Zusammensetzung der Zellen über deren Elementarzusammensetzung. Umgekehrt wird sie durch den Anteil der jeweiligen funktionellen Makromoleküle gesteuert.

Im vorgestellten Modell werden vier Hauptlimitierungen berücksichtigt: Licht, CO<sub>2</sub>, Stickstoff und Phosphor. Eine Limitierung von Licht und CO<sub>2</sub> beeinflusst die Photosyntheserate, während Nährstofflimitierungen den Anabolismus und anschließend die Atmung beeinflussen. Ein Nährstoffmangel hat allerdings keinen Einfluss auf die Photosynthese: Der Photosyntheseapparat aufgrund der Fähigkeit von Mikroalgenzellen zur Akkumulation von Stärke unabhängig arbeiten. Überschüssige Photonen und CO<sub>2</sub> werden von den Zellen zur Synthese von Speicherstoffen genutzt. Bei einer Licht- oder CO<sub>2</sub>-Limitierung kann der Anabolismus ebenso weiter aufrechterhalten werden – sofern zuvor ein Stärkespeicher aufgebaut werden konnte.

### 8.6.3 Reaktormodell kontinuierliche Kultivierung

Das grundsätzliche Verhalten eines kontinuierlich betriebenen PBR kann zunächst simuliert werden, indem eine geeignete Lichtkinetik aufgestellt wird, die auch andere Einschränkungen enthalten kann. Wird das Wachstum von Mikroalgen in einem Photobioreaktor nachgebildet, so ist die erreichbare Wachstumsrate, welche neben der maximalen spezifischen Wachstumsrate auch die Stickstoffaufnahme und -umsetzung sowie die Lichtabsorption und -nutzung beinhaltet (Gleichung (8.17)).

$$r_X = \min \left\{ \sigma_{\text{Ph,BM}} \cdot Y_{\text{BM,Ph}} \cdot \text{PPFD}_{\text{PAR}}, r_{\text{BM,max}}, Y_{\text{BM,N}} \cdot r_N \right\} \quad (8.17)$$

Bei der Simulation eines (kontinuierlich betriebenen) PBR muss zunächst eine geeignete Lichtkinetik berücksichtigt werden. Wird ein einseitig beleuchteter Plattenreaktor betrachtet, so führen die gegenseitige Abschattung der Mikroalgenzellen sowie die Lichtstreuung zu einem Lichtgradienten entlang des Lichtpfades durch den Reaktor ( $d_{\text{Pfad}}$ ) gemäß Gleichung (8.18).

$$I(d_{\text{Pfad}}) = I_0 \cdot e^{-\sigma_{\text{Ph,BM}} \cdot c_{\text{BM}} \cdot d_{\text{Pfad}}} \quad (8.18)$$

Entlang des Lichtpfades sind entsprechend der lokalen Lichtintensität verschiedenen Wachstumsraten möglich. Die gemittelte, scheinbare Wachstumsrate ( $r_{\text{BM,app}}$ ) im gesamten PBR kann durch die sogenannte  $\mu$ -Integration" entlang des Lichtweges über die Reaktordicke ( $d_{\text{R}}$ ) bestimmt werden (Gleichung (8.19)).

$$r_{\text{BM,app}} = \frac{1}{d_{\text{R}}} \int_0^{d_{\text{R}}} r_{\text{X}}(I(d_{\text{Pfad}})) \cdot d_{\text{Pfad}} \quad (8.19)$$

Schließlich kann die Gleichung für die Reaktorbilanz aufgestellt werden.

$$c_{\text{BM}} \cdot r_{\text{BM}} - c_{\text{BM}} \cdot D = 0 \rightarrow r_{\text{BM}} - D = 0 \quad (8.20)$$

Über die sogenannte Lambert-W-Funktion kann dieser Gleichungssatz gelöst werden, um eine numerische Auswertung für Abbildungen zu erhalten. Eine grafische Darstellung der Simulation eines kontinuierlich betriebenen Flachplatten-PBRs mit einseitiger Beleuchtung resultiert in dem in Abschnitt 1.3.1.4 gezeigten Bild (Abbildung 1-5). Dabei wurden die Prozessparameter "Verdünnungsrate  $D$ " und "Lichtintensität  $I_0$ " variiert und die Auswirkungen auf die erzielbare Biomassekonzentration ( $c_{\text{BM}}$ ) dargestellt.

#### 8.6.4 Berechnung stationäre Zustände der Prozessstrategie zur kontinuierlichen Abwasseraufbereitung im 24 h Betrieb

Die Berechnung der Biomassekonzentrationen sowie der residualen N-Konzentration im Reaktorsystem des virtuellen Szenarios bei Licht (Morgen, Mittag, Abend) erfolgte über die Gleichungen (8.21) bis (8.26). Biomassespezifische Raten werden mit  $r$ , reaktorspezifische Raten mit  $R$  abgekürzt.

*Photonenverfügbarkeit im Reaktorsystem:*

$$R_{\text{Ph}} = I_0 \cdot \frac{A_{\text{PBR}}}{V_{\text{PBR}}} \quad (8.21)$$

*Hilfskinetik der zellulären  $\text{NH}_4$ -Aufnahme (einfache lineare Kinetik):*

$$r_{\text{NH}_4} = k_{\text{NH}_4} \cdot c_{\text{NH}_4} \quad (8.22)$$

*Ammoniumbilanz im Reaktor, lediglich der intrazelluläre Speicheranteil nimmt N auf:*

$$R_{\text{NH}_4} = D \cdot c_{\text{NH}_4,0} - r_{\text{NH}_4} \cdot (c_{\text{BTM}} - c_{\text{ABM}}) - D \cdot c_{\text{NH}_4} \quad (8.23)$$

*Bilanz der Biotrockenmasse im Reaktor (lineare Photonenverwertung der Biomasse):*

$$R_{\text{BTM}} = R_{\text{Ph}}/n_{\text{yPh}} - D \cdot c_{\text{BTM}} \quad (8.24)$$

*Bilanz der aktiven Biomasse im Reaktor (lineare Stickstoffverwertung):*

$$R_{\text{ABM}} = M_{\text{N}}/M_{\text{NH}_4} \cdot r_{\text{NH}_4}/q_{\text{N}} \cdot (c_{\text{BTM}} - c_{\text{ABM}}) - D \cdot c_{\text{ABM}} \quad (8.25)$$

*Lösen der Bilanzgleichungen, alle Raten  $R = 0$ :*

$$\text{solve}(\{R_{\text{NH}_4}, R_{\text{BTM}}, R_{\text{ABM}}\}, \{c_{\text{NH}_4}, c_{\text{BTM}}, c_{\text{ABM}}\}) \quad (8.26)$$

Die Lösung ist zwar nicht geschlossen und eindeutig, kann aber numerisch ausgewertet werden.

Abbildung 8-22 zeigt die Ergebnisse der Berechnung für die verschiedenen Szenarien.

Die Berechnungen für die Nachtperiode geschahen mittels der Gleichungen (8.27) bis (8.30) unter Einsatz der experimentell ermittelten Daten aus Kapitel 4.1.

*Ausbeutekoeffizient der N-Aufnahme bei Stärkekonsum ( $C_6$ -Körper):*

$$y_{\text{NH}_4, C_6} = \frac{\Delta_{\text{NH}_4}}{\Delta_{C_6} \cdot c_{\text{BTM}}} \quad (8.27)$$

*Zelluläre  $\text{NH}_4^+$ -Aufnahme in der Nachtphase:*

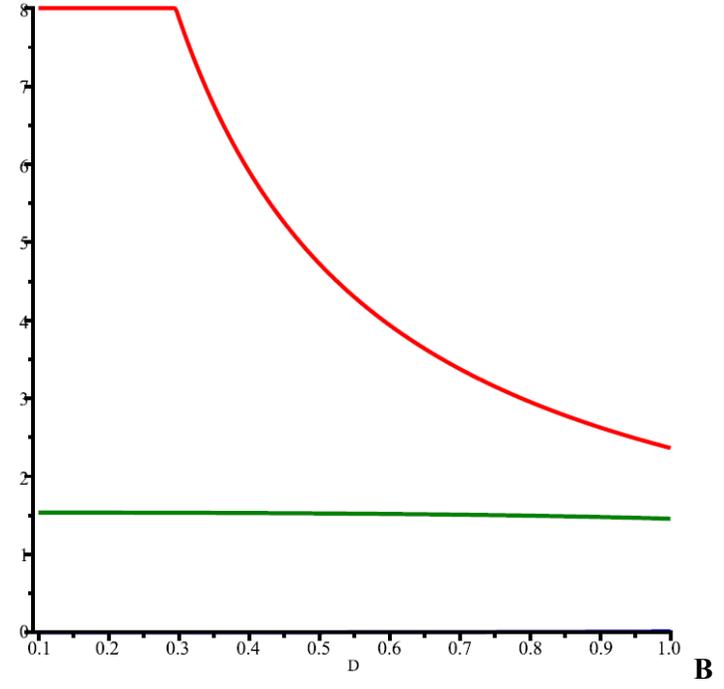
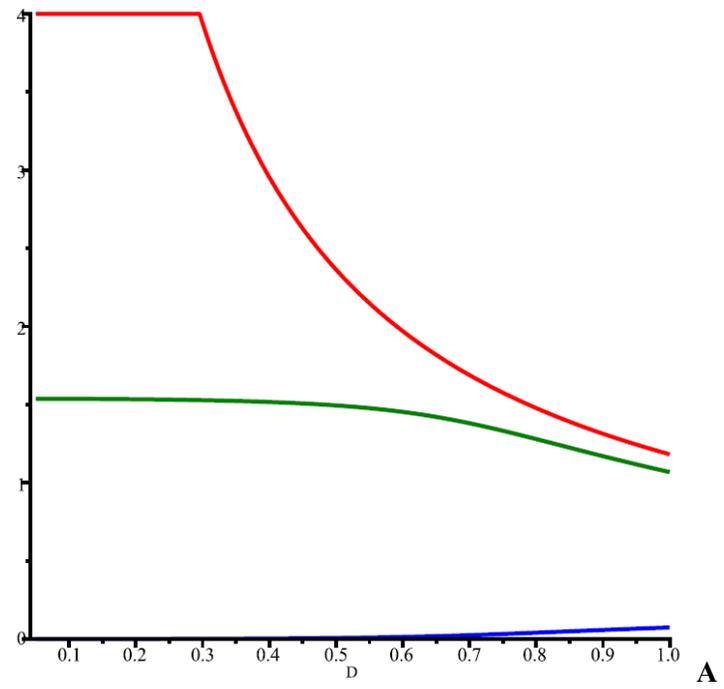
$$r_{\text{NH}_4} = \frac{\Delta_{\text{NH}_4}}{\Delta_t \cdot c_{\text{BTM}}} \quad (8.28)$$

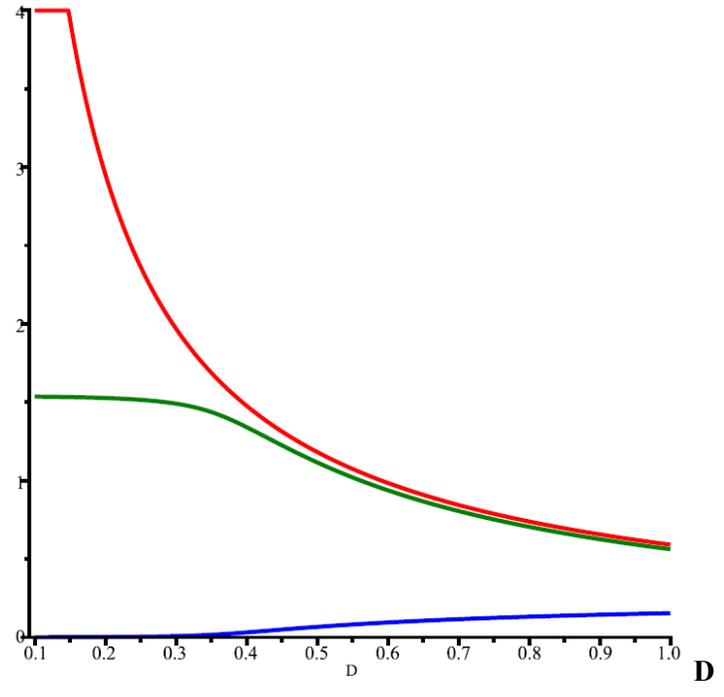
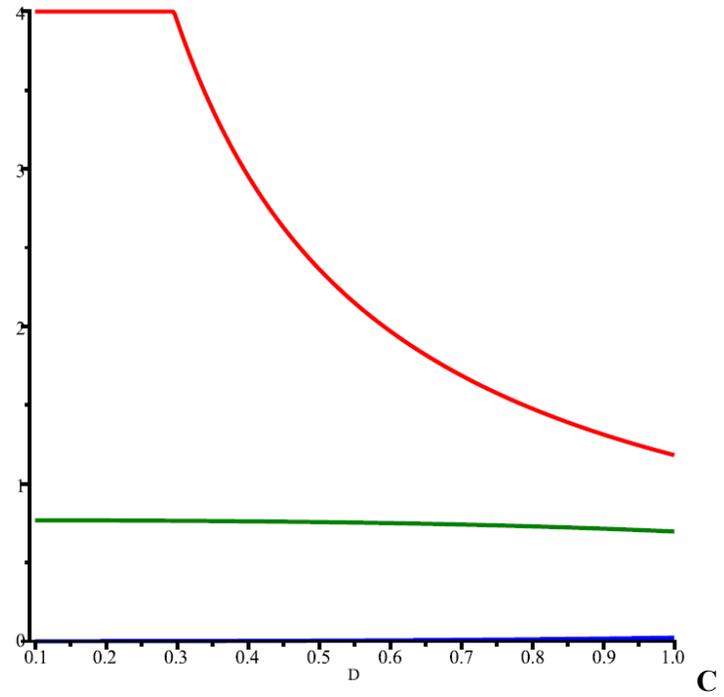
*Mindest-Biomassekonzentration im Reaktor zur vollständigen  $\text{NH}_4^+$ -Aufnahme ( $\Delta_{\text{NH}_4, \text{Soll}}$ ) während der Nachtphase:*

$$c_{\text{BTM}, \text{min}} = \frac{\Delta_{\text{NH}_4, \text{Soll}}}{y_{\text{NH}_4, C_6} \cdot \Delta_{C_6}} \quad (8.29)$$

*$\text{NH}_4^+$ -Aufnahme im Reaktor in der Nachtphase:*

$$R_{\text{NH}_4} = r_{\text{NH}_4} \cdot c_{\text{BTM}, \text{min}} \quad (8.30)$$





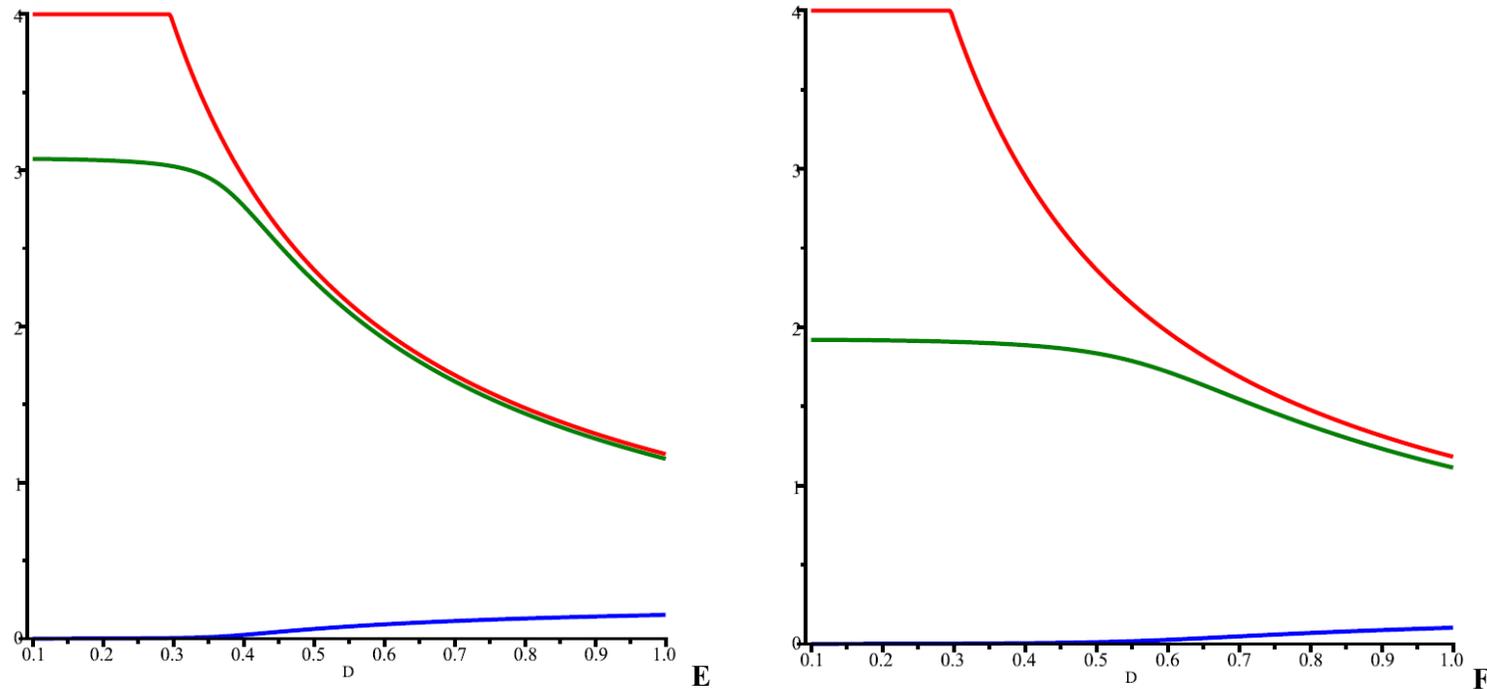


Abbildung 8-22: Ergebnisse der Berechnung der virtuellen Abwasseraufbereitungsstrategie in Abhängigkeit der Verdünnungsrate  $D$  (Biomassekonzentration und verbleibender Stickstoff im Reaktor). rot: Biotrockenmassekonzentration, grün: aktive Biomassekonzentration, blau: residuale  $\text{NH}_3$ -Konzentration im Reaktorsystem. A: Daten für Morgen und Abend, B: Daten für Mittag ohne Abschöpfung von Zellen, C: Daten für Mittag mit Abschöpfung von Zellen, D: Daten für Morgen und Abend für reduzierte Lichtintensität (50 %  $I_0$ ), E: Daten für Morgen und Abend für reduzierte Lichtintensität (80 %  $I_0$ ), F: Daten für Morgen und Abend für reduzierte Lichtintensität (80 %  $I_0$ ) mit Zellrückführung.