

Engelberg, 13–14 June 1980

Honorary Member

Prof. Dr. Eduard Kellenberger, Basel, has been elected honorary member of the Society in recognition of his contribution to the development of microbiology in Switzerland.

Main lectures

These introduced the main topic of the meeting: Bioenergy.

Nutzung der Sonnenenergie-Möglichkeiten mit Mikroorganismen

Use of solar energy biological systems – possibilities with microorganisms

Von R. Bachofen

Institut für Pflanzenbiologie der Universität, Zollikerstrasse 107, CH-8008 Zürich (Schweiz)

From numerous possibilities of biological energy conversion 3 examples with photoautotrophic microorganisms are discussed: *Dunaliella* producing glycerol, *Botryococcus* synthesizing hydrocarbons and photosynthetic bacteria evolving hydrogen in the light. These processes are initiated by environmental stress and lead to a single high energy product with a quantum yield comparable to the solar energy conversion in plants in general. However not enough is known on the regulatory aspects and the biotechnological problems of such large scale photobiological processes are not yet solved.

Zwei Nachteile sind es, welche die Nutzung der Sonnenenergie erschweren: der intermittierende Energiefluss (Tag-Nacht-Rhythmus, Jahreszeiten) und die relativ geringe Leistungsdichte (max. 1 kW/m² bei klarem Himmel und Sonnenhöchststand). Dies erfordert, unabhängig vom Umwandlungssystem, einerseits gute Speichersysteme und andererseits grosse Kollektorflächen. Gegenüber technischen Systemen der Umwandlung von Sonnenenergie in Wärme oder elektrischen Strom bietet hier die biologische Nutzung grosse Vorteile: Biomasse ist eine, verglichen mit Wärme oder elektrischem Strom, leicht speicherbare Energieform, und die nötigen Kollektoren sind in Form von Wiesen, Äckern, Wäldern bereits vorhanden. Die Technologie der Umwandlung von Lichtenergie in Biomasse hat sich in den vergangenen Milliarden Jahren entwickelt in der Evolution der Pflanzen. Es war kaum eine Optimierung nach maximaler Ausbeute bei der Umwandlung von Lichtenergie, sondern eher eine Optimierung nach einem gut funktionierenden Prozess unter weniger günstigen Bedingungen, wie suboptimale Verhältnisse für Licht,

Temperatur und Wasserversorgung. Wie die Tabelle 1 zeigt, ist die weltweit jährlich durch die Photosynthese in Biomasse umgewandelte Sonnenenergie etwa 10mal grösser als der Weltenergieverbrauch¹. Etwa die Hälfte der dabei gebildeten Biomasse ist relativ schwer abbaubar und als Zellulose und Holz z. B. für die Ernährung des Menschen unzugänglich. Der Anteil der als Nahrung genutzten Biomasse ist gering. Der grösste Teil des fixierten CO₂ wird im natürlichen Kohlenstoffkreislauf durch Mikroorganismen minera-

Tabelle 1. Energieverbrauch des Menschen und Grösse der photosynthetischen Energieumwandlung

Jährlicher Energieverbrauch weltweit	$2,3 \cdot 10^{20}$ J	Entsprechend etwa $5 \cdot 10^9$ t Erdöl
Jährliche Sonneneinstrahlung auf die Erde	$3,6 \cdot 10^{24}$ J	
Jährliche Nettoproduktion durch Photosynthese	$3 \cdot 10^{21}$ J	$8 \cdot 10^{10}$ t C $= 2 \cdot 10^{11}$ t Biomasse
Weltweit gespeicherte Biomasse (90% = Bäume)	$20 \cdot 10^{21}$ J	$8 \cdot 10^{11}$ t C
Energieverbrauch des Menschen für Nahrung	$1,4 \cdot 10^{19}$ J	

lisiert und als CO₂ wieder an die Atmosphäre abgegeben. Weltweit wird eine photosynthetische Ausbeute von 0,1 bis 0,3% angegeben; allerdings ist zu berücksichtigen, dass weite Gebiete der Erde unfruchtbar sind und dort keine Umwandlung von Sonnenenergie in Biomasse stattfinden kann. Messungen ergeben für Kulturpflanzen Ausbeuten von wenigen Prozenten (Tabelle 2); unter grosszügiger theoretischer Berechnung aller Verluste in der Pflanze sollte unter optimalen Bedingungen eine solche von 5 bis 6% erreichbar sein. Kürzlich wurden von Algen-Bakterien-Mischkulturen Ausbeuten von 18% berichtet, was in Mitteleuropa etwa dem sehr hohen Ertrag von 240 t TG/ha · Jahr entspräche².

Wie bei den meisten Industriestaaten basiert der Energiekonsum der Schweiz vorwiegend auf dem Öl, und die in den letzten Jahren inszenierten Krisensituationen haben weltweit eine intensive Suche nach Alternativen in Gang gesetzt. Dabei ist die Energieform unserer Urahnen, Biomasse in Form von Holz und anderen Pflanzenprodukten, auch wieder stark ins Gespräch gekommen. Biomasse weist gegenüber Erdöl – übrigens ebenfalls biologischen Ursprungs – einige entscheidende Nachteile auf:

- Der zum Teil hohe Wassergehalt erlaubt keine direkte Verbrennung.
- Die Energiedichte pro Volumen ist wesentlich geringer.
- Die Technologie der Energiefreisetzung aus festen Brennstoffen ist vernachlässigt.
- Für ein Haupteinsatzgebiet des Erdöls, den Transport, ist Biomasse als fester Brennstoff nicht geeignet.

Zwei Wege können eingeschlagen werden, diese Nachteile zu überwinden: Die heute vorhandene Biomasse kann durch physikalische, chemische oder biologische Behandlung aufgewertet werden, z.B. durch Umwandlung in eine Flüssigkeit oder ein Gas. Als biologische Verfahren bieten sich die Gärungen an, die als Endprodukte z.B. Äthanol oder Methan lie-

fern. Die Umwandlungen von Biomasse in Äthanol wird im Beitrag von J. Wiegel, diejenige in Methan im Beitrag von R.S. Wolfe ausführlich diskutiert. Als zweiten Weg sehe ich die Suche nach Produzenten, Pflanzen, die zur Verbrennung, und besonders auch als Rohstoffgrundlage für die Chemie, geeignete Stoffe produzieren als die weitverbreiteten Kohlenhydrate. Solche Verbindungen sollten reduzierter sein als Kohlenhydrate; die Pflanzenorgane, in denen diese Stoffe vorkommen, weniger Wasser enthalten, oder die gesuchten Stoffe müssten leicht vom Wasser abgetrennt werden können. Ferner wäre erwünscht, dass diese Verbindungen einen hohen Anteil der Assimilationsprodukte ausmachen.

Seit langem werden gewisse höhere Pflanzen genutzt wegen des Vorkommens und des hohen Gehaltes an besonderen Pflanzenstoffen; Beispiele wären neben pharmazeutisch interessanten Stoffen etwa der Gummibaum, *Hevea brasiliensis*, oder Wolfsmilchgewächse, wo Kohlenwasserstoffe 10–20% des Trockengewichtes ausmachen können. Ausbeuten von 2 bis 4 t Gummi/ha sind in *Hevea*-Kulturen erzielt worden. Eine weitere Gummipflanze wäre auch Guayule in den Wüsten von Mexiko. Niedermolekulare Kohlenwasserstoffe (z.B. Sesquiterpene) liefern etwa die tropischen Bäume *Copaifera* oder *Croton*.

Können auch Mikroorganismen gefunden werden, die für den zivilisatorisch-menschlichen Energiebedarf eine Rolle spielen könnten? Bisher wurden autotrophe Mikroorganismen, d.h. Algen und photosynthetische Bakterien, etwa zur Produktion von Single-cell-Protein, Aminosäuren oder Vitaminen herangezogen oder zur Extraktion von Alginaten genutzt³. Eine bedeutendere Rolle haben diese Organismen in Abwasserreinigungssystemen, wo als uns interessierendes Produkt gereinigtes Wasser anfällt. Die zusätzlich gebildete Biomasse kann nach mikrobieller Umwandlung als Methan und Dünger genutzt werden. Es sollen nun drei Spezialisten unter Mikroorganismen vorgestellt werden, die mit hoher Ausbeute ein besonderes und energetisch wertvolles Produkt synthetisieren.

Tabelle 2. Photosynthetische Produktivität einiger Kulturpflanzen und Mikroorganismen

	Geschätzte Strahlung (kcal/cm ² · Jahr)	Ertrag (t/ha · Jahr)	Ausbeute in % der photosynthetisch aktiven Strahlung
Zuckerrohr max.	247	137	5,6
Zuckerrübe	247	114	4,4
Mais	247	188	7,7
<i>Scenedesmus</i> (Dortmund)	86	25	2,8
<i>Scenedesmus</i> (Rom)	140	55	3,7
<i>Porphyra</i> (Japan)	110	0,8	0,06
<i>Spirulina</i> (Mexico)	180	65	3,6
Grünalgen (Abwasser, Israel)	180	140	7,8

1. *Dunaliella*

Diese Anfang dieses Jahrhunderts erstmals beschriebene Alge ist ein grüner Flagellat von 10 bis 25 µm Länge. Die Alge kommt vom Brackwasser bis ins konzentrierte Salzwasser vor (0,4–5 M NaCl)⁴. Während das unter ähnlichen Bedingungen wachsende (Fig. 1), ebenfalls halophile *Halobakterium* die Osmoregulation durch hohe innere Na⁺- und K⁺-Konzentrationen erzielt, geschieht diese bei *Dunaliella* durch eine erhöhte Glycerinkonzentration im Zellinnern. Dies erlaubt eine rasche osmotische Regulation ohne Beeinflussung des Zellstoffwechsels. So hemmen schon kleinere Konzentrationen an Na⁺ und K⁺

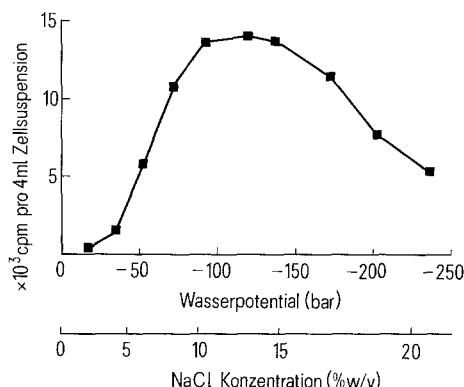
(1,5–2,0 M) viele Enzyme vollständig, dagegen bewirkt eine Glycerinkonzentration von 7 M nur eine Inhibition von 50%⁵. Die Synthese von Glycerin und dessen Umwandlung in osmotisch nicht wirksame Stoffe geschieht innerhalb einer Stunde und ist energieabhängig⁶.

Eine Grosskultur von *Dunaliella* ist einfach, besondere Stoffe im Medium sind nicht nötig, und die Züchtung der Alge unter unsterilen Bedingungen gibt wegen des hohen NaCl-Gehaltes keine Infektionsprobleme. Mit Generationszeiten von 5 bis 24 h können in kurzer Zeit Zelldichten bis 10^8 Zellen/ml erzielt werden. Die Glycerinausbeute ist recht hoch, da Glycerin bis 80% des Trockengewichtes ausmachen kann. Die Ernte der kleinen Zellen und die Lyse derselben ohne Verdünnung des Zellinhaltstes stellen

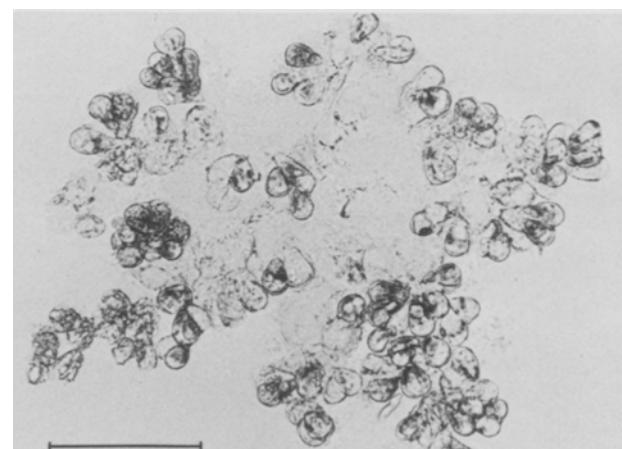
noch einige Probleme⁷. Glycerin (Produktion 1978 in den USA: 250 000 t) ist ein vielseitiges Ausgangsprodukt in der Chemie (Kosmetik, Tabak, Getränke, Sprengstoffe) und kann auch biologisch in Proteine, Äthanol oder Methan umgewandelt werden. Ausser Glycerin können von *Dunaliella* auch Stärke und Proteine genutzt werden.

2. *Botryococcus*

Botryococcus ist weltweit verbreitet. Die Zellen bilden Kolonien, wobei die Einzelzellen durch eine farblose Masse zusammengehalten werden (Figur 2). In wachsendem Zustand ist die Alge grün, im Ruhezustand



Figur 1. CO_2 -Fixierung von *Dunaliella* bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen (aus Brock⁴).



Figur 2. Kolonie von *Botryococcus braunii*. Balken = 50 μm .

Tabelle 3. Zusammensetzung der aus *Botryococcus braunii* extrahierten Kohlenwasserstoffe (aus Hillen und Warren⁸)

Kohlenwasserstoff-Formel	Gelpi et al. (1968)	Maxwell et al. (1969)	Brown et al. (1969)	Belcher (1968)
$\text{C}_{17}\text{H}_{34}$	1,52%	—	—	—
$\text{C}_{23}\text{H}_{46}$	0,14%	—	—	—
$\text{C}_{25}\text{H}_{46}$	0,10%	—	—	—
$\text{C}_{25}\text{H}_{48}$	0,65%	—	—	—
$\text{C}_{27}\text{H}_{52}$	11,10%	—	7,2%	—
$\text{C}_{28}\text{H}_{54}$	0,65%	—	—	—
$\text{C}_{29}\text{H}_{54}$	5,54%	—	23,0%	—
$\text{C}_{29}\text{H}_{56}$	50,40%	—	32,6%	—
$\text{C}_{31}\text{H}_{60}$	27,90%	—	25,1%	—
$\text{C}_{31}\text{H}_{62}$	2,0%	—	—	—
$\text{C}_{34}\text{H}_{58}$	—	83,5%	—	—
$\text{C}_{34}\text{H}_{58}$ (iso)	—	8,2%	—	—
Anderes Öl	—	8,3%	12,1%	—
Total Kohlenwasserstoff in % des Trockengewichts	0,3%	75%	bis 17%	15–22%
Herkunft der Algen	Laboratoriumskultur 1–2 Wochen	Freilandkultur Oakmere, Cheshire	Laboratoriumskultur	Laboratoriumskultur etwa 16 Wochen
Wachstumszustand	exponentiell grün	Algenblüte braun	exponentiell grün	Stationärzustand grün

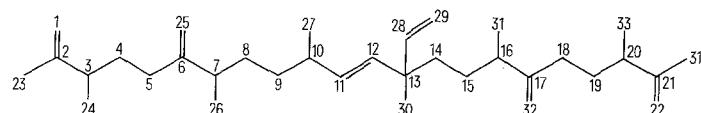
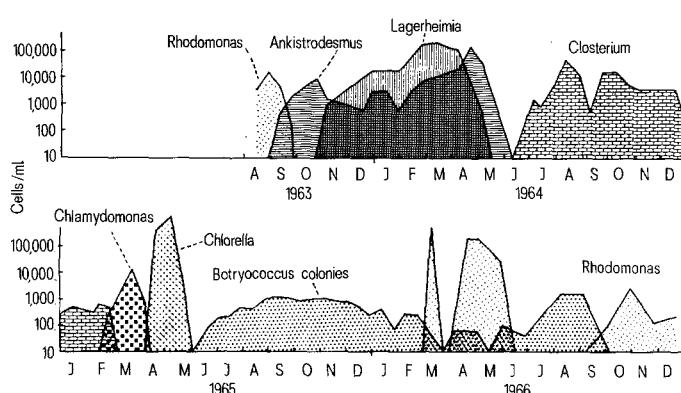


Tabelle 4. Veränderung des Lipidgehaltes durch Umwelteinflüsse

Art des Umwelteinflusses	Organismus	Veränderung	Veränderung des Lipidgehaltes in % des TG
Lichtintensität	<i>Spirulina</i>	10 → 40 klux	4,2 → 6,2
Temperatur	<i>Ochromonas</i>	15 → 30 °C	39 → 53
N-Mangel	<i>Chorella</i>	viel → kein N	10 → 70
Salinität	<i>Botryococcus</i>	0 → 6% NaCl	36 → 51
Alterung	Cyanobakterium, Stamm 92	Jung → Alt	9 → 26
Diverse Faktoren kombiniert	<i>Chorella</i>	Normal → Stress	4,5 → 86

Figur 3. Algensuskzession mit Wasserblüte von *Botryococcus braunii* in Oakmere von 1963 bis 1966 (aus Swale⁹).

dagegen gelborange, was durch eine Akkumulierung von Carotinoiden verursacht wird. Die chemische Zusammensetzung der Alge in den beiden Lebenszuständen zeigt dramatische Unterschiede: Die nicht-verseifbaren Lipide steigen von 0,3% des Trockengewichtes während des Wachstums auf 80% im Ruhezustand, wobei es zur Anhäufung der C₃₄-Kohlenwasserstoffe Botryococcen und Isobotryococcen kommt (Tabelle 3)⁸. Gelegentlich sind in Seen Wasserblüten zu beobachten (Fig. 3)⁹. Beim Übergang in den Ruhezustand wird ein Aufrahmen der Zellen beobachtet, und es kommt am Ufer zu teerähnlichen Ablagerungen, die von der einheimischen Bevölkerung zu Heiz- und Beleuchtungszwecken abgebaut wurden (Korongit, Balkaschit). Es ist bisher nie gelungen, den Ruhezustand in Laborkulturen zu induzieren, und es ist für *Botryococcus* nicht bekannt, welche Außenfaktoren für den Übergang in den Ruhezustand verantwortlich sind. Von vielen Mikroorganismen weiß man, dass Stressbedingungen eine Erhöhung der Lipidsynthese bewirken (Tabelle 4). Solche Stresssituationen können durch Änderung der Licht- oder Temperaturbedingungen, der Stickstoffernährung und durch andere Faktoren hervorgerufen werden.

Werden die Daten der Wasserblüte von Oakmere (Figur 3) auf das Jahr umgerechnet, könnte mit einer Kohlenwasserstoffausbeute von etwa 2,6 t/ha gerechnet werden. Falls sich die Wachstumsrate von *Botryococcus* auf diejenige von *Chlorella* oder *Scenedesmus* steigern liesse, wären Ausbeuten an Kohlenwasserstoffen von 40 t/ha · Jahr zu erzielen, ein Wert, der weit über demjenigen von Landpflanzen heute liegt.

Tabelle 5. Wasserstoffproduktion unter «Freilandbedingungen», Volumen 141, Fläche 0,84 m²

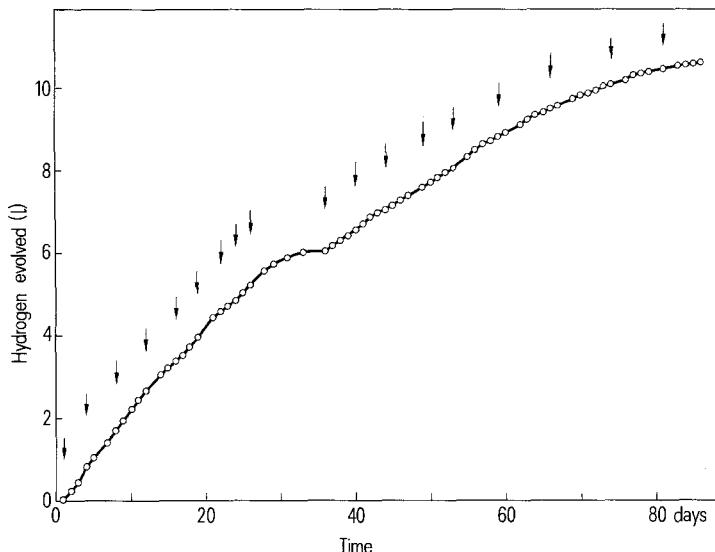
Tag	Gas freigesetzt (l)	Eingestrahlte Energie (kcal)
27. 9.1979	6,0	3200
28. 9.1979	3,0	1300
29. 9.1979	1,0	800
30. 9.1979	1,5	1100
1.10.1979	4,5	2500
2.10.1979	3,5	1100
3.10.1979	4,5	2300

3. Wasserstoffproduktion durch photosynthetische Mikroorganismen^{10,11}

Im normalen Ablauf der Photosynthese werden durch Lichtreaktionen Elektronen von positivem Redoxpotential (in der grünen Pflanze aus Wasser) in einen energiereicheren Zustand gebracht und dabei Kofaktoren von negativem Redoxpotential (Ferredoxin, NADP) reduziert. Letztere wirken als Reduktionsmittel in der CO₂-Assimilation. Falls gleichzeitig das Enzym Hydrogenase in den Zellen vorkommt, können sich unter gewissen Bedingungen Elektronen und Protonen zu gasförmigem Wasserstoff vereinen. In Abwesenheit von gasförmigem Stickstoff (N₂) kann auch das Enzym Nitrogenase diese Reaktion katalysieren. Nitrogenase kommt in photosynthetischen Bakterien und Blaualgen, nicht aber in höheren Pflanzen vor.

Photosynthetische Bakterien, z. B. *Rhodospirillum rubrum*, können auf verschiedensten Substraten wachsen und schliesslich daraus auch H₂ freisetzen. Dies ist besonders dann interessant, wenn verdünnte organische Abfälle, z. B. solche der Milch- und Zuckerrübenverarbeitung, auf diese Art noch energetisch genutzt werden können. Eine allfällige Hemmung der H₂-Freisetzung durch N-Verbindungen kann durch chemische Regulation aufgehoben werden (Figur 4).

In Freilandversuchen konnten Kulturen von *R. rubrum* über Monate gehalten werden, wobei lediglich bei Erwärmungen über 30 °C gekühlt und das System ohne Pumpe umgewälzt wurde. Die Wasserstoffausbeute lag bei 0,5%, bezogen auf die photosynthetisch aktive Strahlung (400–900 nm). Die bisher höchste erzielte Ausbeute lag bei 15 l/0,8 m² · Tag¹² (Tabelle 5).



Figur 4. Wasserstoffproduktion von *R. rubrum* aus Joghurtabfällen (1.-26. Tag) und Molke (36.-81. Tag). Substratzugabe (10 ml/l Kulturflüssigkeit) durch Pfeile angegeben, 500 ml Kulturvolumen (aus Zürrer und Bachofen¹²).

Ein solches H₂ produzierendes System ist vermutlich nur dann wirtschaftlich, wenn H₂ nicht das einzige Produkt der Anlage ist, z. B. wenn die Gasproduktion gekoppelt mit der Reinigung besonders belasteter Abwasser geschieht und die gebildete Biomasse in bezug auf Eiweiß, Aminosäuren und Vitamine ebenfalls ausgenutzt wird.

Bei Blaualgen (Cyanobakterien) ist der Elektronendonator Wasser. Die Fähigkeit, unter anaeroben Bedingungen im Licht H₂ freizusetzen, ist bei dieser Gruppe weit verbreitet und umfasst alle morphologischen Formen¹³. Wasserstoff wird nach einer Periode des Stickstoffmangels freigesetzt. Dies führt zu mehr oder weniger irreversiblen Änderungen der Zellstrukturen, und die Dauer hoher Wasserstoffproduktion im Licht ist nur kurz. Eine deutliche Verlängerung kann durch intermittierende Zugabe von N₂ zur Gasphase erreicht werden. Da Blaualgen zum Bewachsen von Oberflächen neigen, lässt sich mit auf diese Art natürlich immobilisierten Zellen eine Verringerung der sonst zur Rührung des Systems notwendigen Fremdenergie erzielen.

Die drei Beispiele haben gezeigt, dass autotrophe Mikroorganismen direkt mit guter Ausbeute für den Menschen, energetisch oder als Rohstoff, nutzbare Stoffe liefern können. Alle Fälle ergaben aber, dass dies nur unter Stresssituationen von seiten der Umwelt der Fall ist:

- bei *Dunaliella* durch hohe Salzkonzentrationen,
- bei photosynthetischen Bakterien und Blaualgen durch Stickstoffmangel,
- bei *Botryococcus* ist das auslösende Signal noch nicht bekannt.

Obwohl eine technische Nutzung schon angelaufen ist (Glycerinproduktion durch *Dunaliella*), sind zwei Problemkreise noch offen:

- Die Lösung der biotechnologischen Probleme: Wie können genügend grosse Flächen bereitgestellt wer-

den? Wie verhält sich die Stabilität der Kultur unter nichtsterilen Bedingungen? Wie werden die Mikroorganismen nachher vom Substrat getrennt, und wie wird schliesslich aus den Zellen das gewünschte Produkt gewonnen?

- Die Lösung der molekularbiologischen Probleme: Welche Aussenfaktoren bewirken die massive Synthese eines einzelnen, besonderen Produktes, und wie können die Mikroorganismen in der betreffenden Stresssituation stabil gehalten werden?

Experten sehen eine Lösung dieser Probleme in den kommenden 10–20 Jahren. Mikroorganismen offerieren eine Vielfalt von bisher unbekannten Nutzungsmöglichkeiten. Wie weit hier tatsächlich ein echtes Potential vorhanden ist, wird die Zukunft zeigen müssen.

- 1 D.O. Hall, in: Biochemical and photosynthetic aspects of energy production, S. I. Hrsg. A. SanPietro. Academic Press, New York, London 1980.
- 2 S.J. Pirt, Y. Lee, A. Richmond und M.W. Pirt, J. Chem. Tech. Biotech. 30, 25 (1980).
- 3 Z. Dubinsky, T. Berner und S. Aaronson, Biotech. Bioeng. Symp. 8, 51 (1978).
- 4 T.D. Brock, J. gen. Microbiol. 89, 285 (1975).
- 5 K.J. Borowitzka und A.D. Brown, Arch. Microbiol. 96, 37 (1974).
- 6 A. Ben-Amotz, in: Biochemical and photosynthetic aspects of energy production, S. 191. Hrsg. A. SanPietro. Academic Press, New York, London 1980.
- 7 L.A. Williams, E.L. Foo, A.S. Foo, I. Kühn und G.G. Heden, Biotech. Bioeng. Symp. 8, 115 (1978).
- 8 L.W. Hillen und D.R. Warren, Mech. Eng. Rep. 148. Dept. of defence, Aeronaut. Lab. Melbourne, Australia.
- 9 E.M.F. Swale, Br. Phycol. Bull. 3, 441 (1968).
- 10 A. Mitsui, Y. Ohta, J. Frank, S. Kumagawa, C. Hill, D. Rosner, S. Barciella, J. Greenbaum, L. Haynes, L. Oliva, P. Dalton, J. Radway und P. Griffard, in: Proceedings of the 2nd Int. Conf. on alternative energy sources (im Druck).
- 11 P. Weaver, S. Lien und M. Seibert, Photobiological production of hydrogen – a solar energy conversion option. Solar Energy research Institute Golden Colorado (1979).
- 12 H. Zürrer und R. Bachofen, Appl. environ. Microbiol. 37, 789 (1979).
- 13 M. Bächtold und R. Bachofen, Arch. Microbiol. 123, 227 (1979).