



Hochschule Neubrandenburg
University of Applied Sciences

Hochschule Neubrandenburg
Fachbereich Agrarwirtschaft und Lebensmittelwissenschaften

Studiengang Lebensmitteltechnologie
Sommersemester 2021

Antibakterielle Wirkung von Algenextrakten

Bachelorarbeit zur Erlangung des akademischen
Grades

Bachelor of Science

Vorgelegt von: Lena Schnittke

Betreuer: Prof. Dr. Michael Sandmann

Prof. Dr. Marco Ebert

Bearbeitungszeitraum: 04.06.21-05.08.21

URN: urn:nbn:de:gbv:519-thesis 2021-0051-1

Neubrandenburg, 02.08.2021

Abstract

The research of microalgae, especially with regard to possible antibacterial effects, has increased significantly in recent years. Many potential compounds have already been discovered, which could be alternatives to conventional antibiotics. This is a big step forward, because of the increasing resistance of bacteria to antibiotics. The aim of this work was to produce extracts from two microalgae powders, *Chlorella vulgaris* and *Arthrospira platensis*, to examine them for pH, dry matter and polyphenol content and to check whether they have an inhibitory effect on gram-positive and gram-negative bacteria. The antibacterial effect was tested with a diffusion test. A positive control in the form of the antibiotic Polymyxin B was used to ensure that the method works. The inhibitory effect was visible through an inhibition zone. The extracts of both microalgae showed no inhibitory effect on the bacterial cultures used in these experiments. One possible reason could be that the content of antibacterial compounds was too low and the effect was influenced by the other ingredients. However, numerous antibacterial compounds have been found in other studies. Further trials could include adapting the extraction method and extracting potential compounds individually. Afterwards, the effectiveness could be testing again using the diffusion test.

Inhaltsverzeichnis

Abstract	2
Verzeichnis der verwendeten Symbole, Einheiten und Abkürzungen	5
1 Einleitung.....	6
2 Stand der Wissenschaft	7
2.1 Allgemeines zu Mikroalgen	7
2.2 Verwendungsmöglichkeiten von Mikroalgen	8
2.3 Wirkung von Mikroalgen auf Bakterien	9
3 Material und Methoden.....	11
3.1 Verwendete Materialien	11
3.2 Herstellung der Algenextrakte	13
3.3 Charakterisierung der Extrakte.....	14
3.4 Untersuchung der antibakteriellen Wirkung	17
4 Ergebnisse	19
4.1 Herstellung der Algenextrakte	19
4.2 pH- Wert- Messung	21
4.3 Trockensubstanzmessung.....	22
4.4 Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes.....	25
4.5 Untersuchung der antibakteriellen Wirkung	33
4.5.1 Versuch 1.....	33
4.5.2 Versuch 2.....	40

5	Diskussion.....	44
6	Zusammenfassung.....	50
7	Literaturverzeichnis	51
8	Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen	52
9	Verzeichnis der Anlagen.....	53
	Erklärung über die selbstständige Anfertigung der Arbeit.....	56

Verzeichnis der verwendeten Symbole, Einheiten und Abkürzungen

Symbol

g

Bedeutung

Erdbeschleunigung

Einheit

%

Bezeichnung

Verhältnisgröße

g, mg

Masse

ml, μ l

Volumen

°C

Temperatur

min

Zeit

mg/ l, g/ l

Konzentration

nm

Wellenlänge

mg/ g

Massegehalt

g/ mol

Molare Masse

Abkürzungen

*Chlorella**Chlorella vulgaris**Spirulina**Arthrospira platensis*

TS

Trockensubstanz

VF

Verdünnungsfaktor

C1 40

Chlorella- Replikat 1, 40 °C (analog für alle Extrakte)

FCR

Folin- Ciocalteu- Reagenz

1 Einleitung

Die Erforschung und Nutzung von Biomasse aus Mikroalgen hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Aufgrund des hohen Gehaltes an zahlreichen Bioprodukten bieten sich die verschiedensten Einsatzmöglichkeiten. Mikroalgen enthalten große Mengen an Kohlenhydraten, Proteinen und Fetten, aber auch an Vitaminen, phenolischen Antioxidantien, Pigmenten und Mineralen und werden aufgrund dessen als Nahrungsergänzungsmittel, Biopharmazeutika und Biochemikalien genutzt. Auch in der Kosmetik finden sie Anwendung, zum Beispiel als aufhellendes Mittel für die Haut. Besonders den antioxidativen Substanzen wird eine gesundheitsfördernde Wirkung nachgesagt, da sie degenerativen Krankheiten wie Krebs, Osteoporose und Herz- Kreislauf- Erkrankungen, welche unter anderem mit einem Übermaß an freien Radikalen und damit verbundenem oxidativen Stress zusammenhängen, vorbeugen können. (Almendinger et al., 2021)

Ein Beispiel für antioxidative Substanzen in den Mikroalgen sind Polyphenole, welche auch im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden. Zu den Polyphenolen gehören unter anderem Phenolsäuren, Flavonoide, Stilbene und Phenole. (Machu et al., 2015)

Ein weiteres Forschungsgebiet ist die Verwendung von Mikroalgen als antibakterielles Mittel. Durch den häufigen Einsatz von Antibiotika in der Tierhaltung und Zucht kommt es vermehrt zu Resistenzen diesen Mitteln gegenüber. Dies ist sehr problematisch, da so die Bekämpfung pathogener Bakterien erschwert wird. Daher ist es wichtig, nach antibakteriell wirkenden Alternativen zu suchen. (Hensel et al., 2021)

Aus diesen Gründen lautet die Aufgabenstellung dieser Bachelorarbeit, Mikroalgenextrakte herzustellen und zu charakterisieren. Im Anschluss daran wird eine mögliche antibakterielle Wirkung mit Hilfe des Hemmhoftestes untersucht. Dafür werden zwei, als getrocknete Pulver vorliegende Algenstämme, verwendet.

Ziel der Bachelorarbeit ist es, zu untersuchen, ob und inwieweit die verschiedenen Algenstämme eine Wirkung auf das Wachstum grampositiver und gramnegativer Bakterien haben. Es ist möglich, dass sich die Wirkung bei beiden Arten aufgrund des unterschiedlichen Aufbaus der Zellwände unterscheidet. Dies ist auch bei Antibiotika der Fall, da der Wirkungsmechanismus auf den Aufbau einer der beiden Arten ausgelegt sein kann, sodass eine mögliche Wirkung der Extrakte auch nur bei einer der beiden Bakterienkulturen auftreten könnte.

2 Stand der Wissenschaft

2.1 Allgemeines zu Mikroalgen

Algen sind meist photosynthetische Organismen, welche in aquatischen Lebensräumen vorkommen, zum Beispiel in Seen, Ozeanen, Flüssen und Abwässern. Sie besitzen eine hohe Toleranz gegenüber äußeren Einflüssen wie pH- Wert und Salzgehalt des Wassers. Man unterscheidet Rotalgen, Braunalgen und Grünalgen. Diese können sowohl makroskopisch, als Seetang bezeichnet, als auch mikroskopisch sein. Während Makroalgen immer vielzellig sind, sind Mikroalgen einzellig, prokaryotisch, sowie eukaryotisch. (Khan et al., 2018)

Im Folgenden werden ausgewählte Algenarten genauer erläutert, da diese in den Versuchen dieser Arbeit verwendet werden. Es handelt sich dabei um die getrockneten Pulver von *Chlorella vulgaris* und *Arthrospira platensis*.

Chlorella vulgaris (kurz *Chlorella*) ist eine einzellige, eukaryotische, mikroskopische Grünalge, die in Süßwasserlebensräumen vorkommt. Sie ist die am häufigsten kultivierte Mikroalge, da sie schon jetzt vielfach in der Industrie angewendet wird. Ihr hoher Gehalt an Bioprodukten setzt sich wie folgt zusammen: 20 % Kohlenhydrate, 20 % Fett, 45 % Eiweiß, 10 % Mineralien und Vitamine und 5 % Ballaststoffe. (El- Naggar et al., 2020)

Arthrospira platensis, wegen der Spiralform oft nur *Spirulina* genannt, ist ein prokaryotisches Süßwasser- Cyanobakterium. Da man die Gruppe der Cyanobakterien aufgrund ihrer ähnlichen Eigenschaften als Blaualgen bezeichnet, wird das Bakterium zu den Mikroalgen gezählt. Aufgrund des hohen Gehaltes an Protein, welcher über 60 % in der Trockenmasse betragen kann, findet *Spirulina* besonders in der Lebensmittelindustrie als Nahrungsergänzungsmittel oder Lebensmittelzusatz Anwendung. (Martelli et al., 2020) Cyanobakterien spielen eine wichtige Rolle als Bestandteil des Phytoplanktons im Ozean. Sie gehören zu den wichtigsten Sauerstoffproduzenten, fixieren Stickstoff und können sowohl als Einzelzelle vorkommen, als auch mehrzellige Formen annehmen und symbiotische Partnerschaften mit anderen Pflanzen und Tieren eingehen. (Rojas et al., 2020)

2.2 Verwendungsmöglichkeiten von Mikroalgen

Aufgrund der stetig wachsenden Weltbevölkerung steigt die Nachfrage nach Brennstoffenergie. Da die Quelle an fossilen Brennstoffen bald erschöpft ist, hat die Erforschung der Nutzung von Biokraftstoffen aus Algen in den letzten Jahren stark zugenommen. Biomasse aus Algen stellt zum Beispiel für die Herstellung von Bioethanol eine erneuerbare und zugleich weniger umweltbelastende Alternative dar. Biokraftstoffe auf der Basis von Mikroalgen sind zudem ungiftig und in der Lage globales CO₂ zu binden. Außerdem benötigen Mikroalgen bei der Kultivierung weder Land noch Süßwasser. Es fällt außerdem der Nachteil der Konkurrenz als Nahrungsmittel weg, was zum Beispiel bei der Herstellung von Biokraftstoffen der zweiten Generation aus Landpflanzen, die die Menschheit auch als Nahrungsmittel nutzt, der Fall ist. Zurzeit ist Bioethanol der wichtigste Biokraftstoff. Er hat gegenüber fossilen Brennstoffen den Vorteil, bei der Verbrennung weniger Treibhausgase zu erzeugen und kann in der Autoindustrie ohne Modifikationen verwendet werden. Bioethanol wird unter anderem aus Mais, Zuckerrohr, Zuckerrüben oder Weizen hergestellt. Da es auch hier eine Konkurrenz als Nahrungs- und Futtermittel gibt, rücken Mikroalgen als alternative Quelle in den Fokus. Sie besitzen hohe Gehälter an Kohlenhydraten wie Stärke, Glykogen und Cellulose, welche leicht in einfache Zucker umgewandelt werden können. Jedoch stellen Mikroalgen bisher noch eine sehr kostenintensive Alternative dar. Damit sich dieses Verfahren wirtschaftlich rentiert, muss der Ertrag an Algenbiomasse maximiert und die Betriebskosten reduziert werden. Die Prozesse der Algenkultivierung, sowie der Produktion von kohlenhydratreichen Biomassen müssen dazu optimiert werden. Um dies zu verwirklichen, arbeiten und forschen bereits viele Unternehmen an dieser Thematik. (Khan et al., 2018)

Aufgrund des hohen Gehaltes an Proteinen, Fettsäuren, Polysacchariden, Vitaminen und Mineralstoffen von Mikroalgen werden diese auch in der Lebensmittelindustrie beispielsweise als Nahrungsergänzungsmittel eingesetzt. Auch als Zusatz in funktionellen Lebensmitteln können Mikroalgen verwendet werden. Diese funktionellen Lebensmittel haben neben dem Decken des Nährstoffbedarfes auch positive gesundheitliche Auswirkungen auf den Körper und die Nachfrage nach solchen Nahrungsmitteln steigt mit zunehmendem Bewusstsein über die Auswirkung der Ernährung auf die Gesundheit des Menschen. Je nach Produktgruppe werden Mikroalgen in verschiedensten Formen zu den Lebensmitteln dazugegeben, zum Beispiel als Pulver oder Flüssigkeit. Die Darreichungsformen der Mikroalgen als Nahrungsergänzungsmittel sind Tabletten oder Kapseln. Die Nachteile bei Letzterem liegen jedoch bei den sensorischen Aspekten, wie der sehr dunklen grünen Farbe und dem unangenehmen Geschmack. Aus diesem Grund ist es für die Lebensmittelindustrie einfacher, Lebensmittel mit Mikroalgen anzureichern

und so als funktionelles Lebensmittel zu vermarkten, statt die Mikroalgen als Grundnahrungsmittel zu verwenden.

Auch für Tiere wurden Zusätze von Mikroalgen zum Futter bereits mit dem Ergebnis angewendet, dass die Zusätze einen positiven Effekt auf die Tiergesundheit haben, indem zum Beispiel die Darmfunktion, die Krankheitsresistenz und der Schutz vor Bakterien verbessert werden. (Camacho et al., 2019)

Arthrospira platensis wird hauptsächlich als Futtermittel für viele verschiedene Tierarten verwendet. Dies betrifft neben Nutztieren wie Rindern und Schweinen auch Heimtiere wie Hunde und Katzen, sowie die Tiere, welche in Aquakulturen gezüchtet werden. Über 50 % der *Spirulina*- Produktion wird als Futterergänzungsmittel angewendet und circa 30 % der weltweiten Algenproduktion werden für Tierfutteranwendungen verkauft. Die beiden verwendeten Mikroalgen- Arten *Chlorella* und *Spirulina* sind außerdem im Bereich der Kosmetik etabliert. Dort werden sie zum Beispiel in Gesichts-, Haut- und Haarpflegeprodukten, aber auch in Sonnenschutzmitteln eingesetzt. *Spirulina* wird eine hautstraffende und *Chlorella* eine regenerierende Wirkung nachgesagt, weshalb sich diese Mikroalgen besonders in Anti- Aging Produkten wiederfinden. (Spolaore et al., 2006)

2.3 Wirkung von Mikroalgen auf Bakterien

Die Erforschung mariner Organismen zur Bekämpfung von Krankheiten hat bereits große Fortschritte gemacht. Traditionell wurden Algen bisher meist für Nahrung oder Tierfutter verwendet, jedoch wurden bereits pharmakologisch aktive Verbindungen gefunden, die potentiell gegen Viren, Bakterien, Pilze und andere Krankheitserreger wirksam sind. Diese Entdeckungen ermöglichen die Erweiterung des Einsatzes von Mikroalgen und stellen ein großes Forschungspotential dar. Die Mikroalgen müssen sich in ihrem Lebensraum unter anderem vor osmotischem Stress, UV- Licht und Fressfeinden schützen und haben dafür ihr eigenes System entwickelt, indem sie bestimmte Chemikalien produzieren, die sie schützen. Jedoch stellen auch die im Wasser lebenden Bakterien eine Bedrohung für sie dar, wodurch sie auch Verbindungen produzieren, die gegen diese wirksam sind. Diese antibakteriellen Verbindungen sind Sekundärmetabolite wie zum Beispiel Alkaloide, Fettsäuren, Terpene und Peptide. All diese Verbindungen haben verschiedene pharmakologische Wirkmechanismen, zum Beispiel wird in der Publikation von Shannon und Abu- Ghannam berichtet, dass langkettige Fettsäuren aus grünen Mikroalgen wie *Chlorella*, als Hemmstoffe auf unterschiedliche Bakterienarten wirken,

indem sie die Elektronentransportkette und die Phosphorylierung in den Zellmembranen von Bakterien hemmen, was zur Lyse der Zelle führt. Auch Polysaccharide besitzen eine antibakterielle Aktivität. Die Glykoproteinrezeptoren, welche sich auf der Oberfläche von Polysacchariden befinden, können an Bestandteile der Bakterienzellwand, der Membran und der bakteriellen DNA binden und führen zu einer erhöhten Durchlässigkeit, sowie zum Eiweißaustritt. Aus diesem Grund wurden Polysaccharide bereits als orale Antibiotika verwendet, da sie unter anderem das Wachstum von den in dieser Arbeit verwendeten *Escherichia coli* Bakterien hemmen. Aufgrund der weltweit zunehmenden Resistenz pathogener Bakterien gegen Antibiotika wird besonders in diesem Rahmen nach Substanzen gesucht. (Shannon; Abu- Ghannam, 2016)

Die erste antibakterielle Verbindung, die aus der Mikroalge *Chlorella* isoliert wurde, war das Chlorellin. Es handelt sich dabei um eine Mischung aus Fettsäuren, welche hemmende Wirkung sowohl auf gramnegative, als auch grampositive Bakterien hatte. In der darauffolgenden Zeit wurden viele weitere potentiell antibakteriell wirkende Verbindungen, wie Alkaloide, Pigmente, Phenolverbindungen, Indole und Peptide, gefunden. (Rojas et al., 2020) Aufgrund der hohen Menge an Substanzen, welche für die antibakterielle Wirkung verantwortlich sein können, sollen in dieser Arbeit die Extrakte der gesamten wasserlöslichen Biomasse der Algen auf diese Wirkung getestet werden. Durch die vielen Studien, welche zahlreiche antibakteriell wirkende Substanzen in Mikroalgen gefunden haben, ist davon auszugehen, dass die Extrakte als Ganzes ebenfalls eine hemmende Wirkung auf die Bakterienkulturen haben können. Jedoch muss bedacht werden, dass bei allen dieser Studien die aktiven Substanzen, bevor sie auf ihre antibakterielle Wirkung getestet wurden, aus den Mikroalgen isoliert wurden. Die Wechselwirkung mit anderen Verbindungen war dadurch ausgeschlossen. Dies ist in dieser Arbeit nicht der Fall, was das Ergebnis beeinflussen könnte. Je nachdem, wie die Versuche ausfallen, könnte man die Extrakte weiter chemisch aufschlüsseln um einzelne Komponenten zu untersuchen, was jedoch den Rahmen dieser Arbeit überschreiten würde.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Materialien

In der folgenden Tabelle sind alle verwendeten Materialien und Geräte aufgelistet.

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Materialien

Gerät	Modell	Hersteller
Extrakterstellung:		
Wasserbad groß	1083	GFL
Präzisionswaage	Sartorius Entris	Sartorius
Zentrifuge Mibi	Sigma 3 K 30	Sigma
Zentrifuge Chemie	Sigma 3-16 PK	Sigma
Extraktcharakterisierung:		
pH- Meter	pH- Meter 766 Calimatic	Knick
Magnetrührer	RSM-103	Phoenix Instrument
Schnellfeuchtebestimmer	MA 40	Sartorius
Photometer	UV-3100 PC Spectrophotometer	VWR
Analysenwaage	770 412-14	Kern
Vortexer	REAX 2000	Heidolph
Prüfung der antibakteriellen Wirkung:		
Filterpapier	597 Rundfilter 150 mm	Whatman® Schleicher & Schuell
Küvetten	Rotilabo®-Einmal-Küvetten, PS Halbmikro 1,6 ml	Roth
Sterile Impföse	Inoculating loops 10 µl	Kartell Labware
Schüttler	TH 30	Edmund Bühler
Vortexer	REAX 2000	Heidolph

In Tabelle 2 sind die verwendeten Chemikalien und Medien aufgelistet.

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien

Chemikalie/ Medium	Artikelnummer	Hersteller
Chlorella vulgaris Pulver	BL006-55	Biotiva®
Arthrospira platensis Pulver	121F003	MySuperfoods
Natriumcarbonat wasserfrei	A1352, 1000	AppliChem
Folin & Ciocalteu's phenol reagent	F9252-100ML	Sigma- Aldrich
Gallussäure- Monohydrat	48630 100 g	Fluka
Tryptone Soya Agar (Caso- Agar)	A5889,0500	AppliChem
Caso- Bouillon	X938.2	Roth
Agar- Agar	5210.2	Roth

Des Weiteren wurden bei allen Versuchen Glasgeräte wie Erlenmeyerkolben, Messkolben, kleine und große Schott- Flaschen, sowie Bechergläser der Firmen Fisherbrand, Simax, Boro und Schott Duran verwendet.

Als Bakterienkulturen wurden zwei bereits vorbereitete Platten mit den ausgestrichenen Kulturen von *Escherichia coli* und *Staphylococcus epidermidis* verwendet. Die *Staph. epidermidis*- Kultur wurde am 10.06.21 und die *E. coli*- Kultur am 14.06.21 angelegt.

3.2 Herstellung der Algenextrakte

Um die Algenextrakte aus den getrockneten Algenpulvern herzustellen, wurde das Verfahren der Heißwasser-Extraktion angewendet. Dazu wurden zuerst Suspensionen mit einer Konzentration von 7 % hergestellt, indem für jede der beiden Algen drei Mal jeweils 66,5 g des Pulvers in eine Flasche eingewogen und anschließend mit destilliertem Wasser auf 950 ml aufgefüllt wurden. Es wurden jeweils drei gleiche Suspensionen pro Alge hergestellt, um drei Replikate zu erhalten, sodass man am Ende eine Dreifachbestimmung hat. Die entstandenen sechs Suspensionen wurden danach nochmal jeweils drei Mal aufgeteilt, da die Extraktion bei drei verschiedenen Temperaturen durchgeführt wurde. Dazu wurden zwei Mal 250 ml und einmal 450 ml von den 950 ml in je einen 500 ml Erlenmeyerkolben überführt. Die ungleiche Menge resultierte daraus, dass später aus den gewonnenen Extrakten pro Replikate 200 ml als Rückstellprobe abgenommen werden sollten, sodass nach dieser Entnahme von den 450 ml alle Extrakte etwa das gleiche Volumen aufwiesen und somit von jedem Extrakt eine ähnliche Menge für alle nachfolgenden Versuche zur Verfügung stand.

Durch die Wärmebehandlung im Wasserbad bei 40 °C, 70 °C und 99 °C ergaben sich 18 Suspensionen in Erlenmeyerkolben. Für die Übersichtlichkeit sind im folgenden Baumdiagramm in Abbildung 1 beispielhaft die Bezeichnungen der einzelnen Suspensionen, beziehungsweise der späteren Extrakte für *Chlorella vulgaris* aufgelistet.

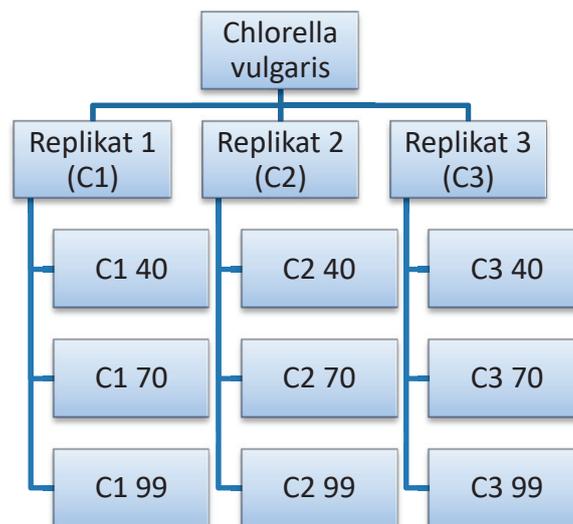


Abbildung 1: Übersicht der einzelnen Extrakte

Die Zahlen hinter den Bezeichnungen der Replikate stehen für die entsprechenden Temperaturen, bei welcher die Suspensionen behandelt wurden. Es ergaben sich analog für *Spirulina* die Suspensionen S1 40 bis S3 99. Insgesamt wurden demnach 18 Extrakte hergestellt, neun pro Alge.

Für die Wärmebehandlung wurden die einzelnen Erlenmeyerkolben mit einem Stopfen verschlossen und mit Gewichten beschwert im Wasserbad für je eine Stunde bei der entsprechenden Temperatur erhitzt, nachdem das Wasserbad auf die Temperatur hochgeheizt war. Zusätzlich zu den Suspensionen wurde bei 99 °C auch eine Negativkontrolle, welche aus destilliertem Wasser bestand, mit erhitzt.

Nachdem die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurden sie für 30 min bei 3000 g zentrifugiert. Da in die Zentrifuge nur ein Volumen von sechs Mal 50 ml zentrifugiert werden konnte, musste jede Suspension einzeln zentrifugiert werden. Dafür wurden auf der Waage fünf Mal circa 50 ml der Suspension eingewogen und das sechste Röhrchen mit Wasser befüllt, wobei die Masse Wasser der Masse an Suspension des fünften Röhrchens entsprach, sodass sich die gleichen Massen in der Zentrifuge zum Vermeiden von Unwucht gegenüberlagen. Anschließend wurden die Extrakte in Glasflaschen abgegossen und die unlöslichen Pellets verworfen. (Hensel et al., 2021)

Von den Extrakten, welche bei 99 °C erhitzt wurden, wurden je fünf Rückstellproben à 40 ml in 50 ml Röhrchen entnommen, also 200 ml pro Replikat, und anschließend bei -20 °C eingefroren.

3.3 Charakterisierung der Extrakte

Um die gewonnen Extrakte zu charakterisieren und so einen Eindruck über deren Eigenschaften zu erhalten, wurden die Trockensubstanz, der pH- Wert und der Gesamtgehalt an Polyphenolen bestimmt. Zur Bestimmung der Trockensubstanz wurde ein Schnellfeuchtebestimmer verwendet. Dazu wurde ein Filterpapier auf der Waage des Gerätes eingewogen und tariert und anschließend circa ein Gramm der Probe mit einer Pipette auf das Filterpapier getropft. Durch Schließen des Feuchtebestimmers wurde die Messung automatisch gestartet, wobei die Probe auf 105 °C erhitzt wurde und solange die Masse gewogen wurde, bis diese konstant blieb. Bei Massekonstanz wurde die Messung automatisch gestoppt und die Werte konnten abgelesen werden. Für die Proben wurden jeweils das Ausgangsgewicht und die Trockensubstanz in Prozent notiert. Jede Probe wurde drei Mal gemessen.

Der pH- Wert wurde mittels pH- Meter ermittelt, wofür ein wenig der Probe in ein Becherglas

mit einem Magnetrührer gegeben und während der Messung gerührt wurde. Das pH- Meter wurde vor der Messung mit den Kalibrierlösungen kalibriert. Auch hier wurde jedes Extrakt drei Mal gemessen.

Zur Ermittlung des Gesamtpolyphenolgehaltes wurden die modifizierten Methoden von Weizenegger und Steffan, sowie von Almedinger et al. angewendet. Bei dieser Methode kommt es durch das Folin- Ciocalteu- Reagenz bei Anwesenheit von polyphenolischen Verbindungen zu einem blauen Farbumschlag, welcher photometrisch ausgewertet werden kann. Es handelt sich dabei um eine Redoxreaktion, bei der die Phenole im alkalischen Milieu mit den Verbindungen des Reagenzes reagieren und oxidieren, während das Reagenz selbst reduziert wird, wodurch die Farbe von gelb zu blau umschlägt. (Rumpf, 2018)

Um den genauen Gehalt zu bestimmen, wurde zunächst eine Standardreihe aus Gallussäure-Monohydrat hergestellt. Dazu wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 500 mg/ l benötigt, welche hergestellt wurde, indem 50 mg der festen Säure in einem Messkolben eingewogen und auf 100 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt wurden. Des Weiteren wurden vor Beginn des Versuches 250 ml gesättigte Natriumcarbonatlösung hergestellt, indem so viel der Substanz in destilliertem Wasser gelöst wurde, bis sich ein unlöslicher Bodensatz bildete. Die Kalibrierreihe aus Gallussäure wurde nach folgendem Pipettierschema erstellt:

Tabelle 3: Pipettierschema Gallussäure- Kalibrierreihe

Volumen an Gallussäure in µl	10	20	40	60	80	100	0
Volumen an destilliertem Wasser in µl	90	80	60	40	20	0	100
Konzentration in mg/ l	50	100	200	300	400	500	0

Die Kalibrierreihe wurde hergestellt, indem die entsprechenden Mengen der Gallussäure-Stammlösung direkt in die Küvetten pipettiert und anschließend mit der entsprechenden Menge Wasser aufgefüllt wurden. Der Blindwert enthielt ausschließlich Wasser. Anschließend wurden in jede Küvette 500 µl der Folin- Ciocalteu- Reagenz (FCR) gegeben, das Ganze mit einem Rührstab vermischt und für 3 min inkubiert. Danach wurde 1 ml der gesättigten Natriumcarbonatlösung hinzugegeben, wieder gemischt und für 1 h im Dunkeln inkubieren gelassen. Beide Inkubationen erfolgten bei Raumtemperatur.

Nach der zweiten Inkubation wurden die Kalibrierproben bei 720 nm im Photometer gemessen und die gemessene Extinktion über die Konzentration auf der x- Achse in einem Diagramm dargestellt. In der nachfolgenden Tabelle 4 sind die Werte der Kalibrierreihe aufgelistet.

Tabelle 4: Kalibrierwerte

Konzentration Gallussäure in mg/ l	Extinktion
0	0,085
50	0,091
100	0,142
200	0,403
300	0,742
400	1,127
500	1,512

Durch diese Kalibrierreihe entstand folgende Kalibriergerade:

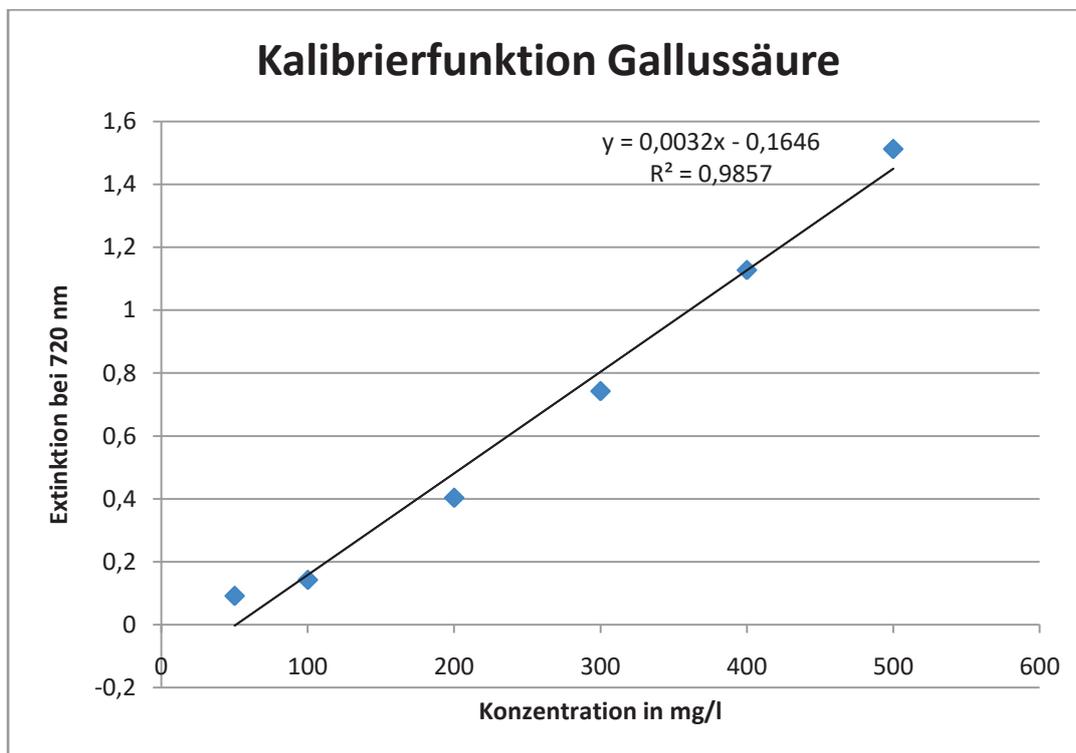


Abbildung 2: Kalibrierfunktion Gallussäure

Die lineare Funktion, welche sich aus der Kalibriergeraden in Abbildung 2 ergab, lautete $y = 0,0032x - 0,1646$

Das Bestimmtheitsmaß R^2 der linearen Regression betrug 0,9857.

Der Blindwert wurde bei der Erstellung der Geraden nicht mit einbezogen, da dieser im Vergleich zu den Standardwerten mit einer Extinktion von 0,085 sehr hoch war. Zum Vergleich, die Extinktion des Standards mit der Konzentration 50 mg/ l betrug 0,091.

Die Messung der Proben erfolgte, indem zunächst für jedes Extrakt 120 µl einer 1/2 Verdünnung mit destilliertem Wasser hergestellt wurde. Von dieser Verdünnung wurden von jeder Probe 100 µl in ein Reagenzglas pipettiert. Anschließend wurden 8,4 ml Wasser dazugegeben. Für den Blindwert wurde auch hier nur Wasser, 8,5 ml, verwendet. Anschließend wurden in jedes Röhrchen 500 µl des FCR gegeben, geschüttelt und 3 min inkubieren gelassen. Danach wurde in jedes Reagenzglas 1 ml der Natriumcarbonatlösung gegeben, wieder geschüttelt und anschließend für 1 h im Dunkeln stehen gelassen. Nach der Inkubation im Dunkeln wurde etwas von den Proben in je eine Küvette gegeben und im Photometer ebenfalls bei 720 nm gemessen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Kalibrierkurve rechnerisch. (Almendinger et al., 2021)

3.4 Untersuchung der antibakteriellen Wirkung

Um herauszufinden, ob und inwieweit die hergestellten Mikroalgenextrakte eine antibakterielle Wirkung besitzen, wurde ein Hemmhoftest, auch Diffusionstest genannt, durchgeführt. Dazu wurden zunächst die benötigten Nährmedien hergestellt. Von dem Caso- Agar wurden 250 ml hergestellt. Da man laut des Herstellers 40 g/ l benötigt, wurden demnach 10 g für 250 ml des pulverförmigen Agars in einer Glasflasche eingewogen und auf 250 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Der Weichagar setzte sich aus Caso- Bouillon und 0,4 % -igem Agar- Agar zusammen. Vom Weichagar wurden 50 ml hergestellt, indem 1,5 g Caso- Bouillon und 0,2 g Agar- Agar abgewogen und auf 50 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt wurden. Für die Caso- Bouillon lag die Mengenangabe bei 30 g/ l, aus der sich die 1,5 g/ 50 ml ergaben. Als Nährmedium für die beiden Bakterienkulturen wurde zwei Mal 250 ml Caso- Bouillon angesetzt, indem 7,5 g Bouillon auf 250 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt wurden. Des Weiteren wurden 12 kleine Reagenzgläser mit einem Stopfen versehen und mit Alufolie bedeckt in ein Becherglas gestellt. Außerdem wurden die Filterpapier Testplättchen vorbereitet, indem mit einem Locher aus einem Filterpapier kleine Scheiben ausgestanzt wurden. Auch diese wurden in einem Becherglas gesammelt und mit Alufolie abgedeckt. Die beiden Bechergläser, sowie sämtliche hergestellte Medien wurden dann bei 121 °C autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurden der Weichagar und der Caso- Agar in ein 51 °C warmes Wasserbad gestellt. Während der Caso- Agar so abkühlte, wurden 12 Petrischalen vorbereitet. Nachdem der Caso- Agar ausreichend abgekühlt war, wurde dieser in jede der Petrischalen gegossen, sodass diese etwa zur

Hälfte gefüllt waren. Anschließend wurden die Deckel aufgelegt und der Agar erstarren gelassen. Nachdem die Masse fest war, wurden alle Platten über Nacht im Kühlraum bei 4 °C gelagert. Der Weichagar verblieb die Nacht über in dem 51 °C warmen Wasserbad. Die beiden Nährmedien für die Bakterienkulturen wurden bei Raumtemperatur abkühlen gelassen und anschließend mit Hilfe einer sterilen Impföse angeimpft, indem mit der Öse etwas von der betreffenden Bakterienkultur, also *Escherichia coli* oder *Staphylococcus epidermidis*, welche auf einer Agar- Platte vorlagen, aufgenommen und in das Nährmedium gegeben wurde. Die beiden angeimpften Kulturen wurden dann über Nacht im Schüttler bei 37 °C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden für jede Platte 2,5 ml des Weichagars mit einer Pipette in eines der kleinen Reagenzgläser gegeben und mit 500 µl der entsprechenden Bakterienkultur aus dem Schüttler versetzt, kurz mittels Vortexer gemischt und sofort auf die entsprechende Platte auf den festen Caso- Agar gegossen und durch leichtes Schwenken gleichmäßig verteilt. So wurde mit jeder Platte verfahren. Der Weichagar wurde ebenfalls erstarren gelassen. Anschließend wurden die Extrakte auf die Platten gebracht, indem je ein Filterpapier mit einem kleinen Tropfen des Extraktes aus einer Pipette getränkt und anschließend auf die dafür vorgesehene Stelle der Platte gelegt wurde. Das Filterpapier wurde mit einer Pinzette platziert, welche nach jedem Gebrauch über einer Gasbrennerflamme sterilisiert wurde. Auf jede Platte wurde außerdem als Positivkontrolle ein fertiges Testplättchen mit dem Antibiotikum Polymyxin B gelegt, sowie eine Negativkontrolle in Form eines Filterpapierplättchens, welches mit der bei den Versuchen mitgeführten Negativkontrolle, bestehend aus Wasser, getränkt war. Auf jeder Platte befanden sich fünf Testplättchen, bestehend aus den drei Extrakten eines Replikates jeder Alge, also zum Beispiel C1 40, C1 70 und C1 99, sowie der Positiv- und der Negativkontrolle. Nachdem sich alle Extrakte und Kontrollen auf der vorgesehenen Platte befanden, wurden alle 12 Platten bei 37 °C in den Brutschrank gestellt, wo sie für zwei Tage inkubierten und anschließend ausgewertet wurden.

4 Ergebnisse

4.1 Herstellung der Algenextrakte

Bei der Herstellung der Mikroalgenextrakte kam es zu starker Schaum- und Klumpenbildung, besonders bei *Spirulina*. Um dem entgegenzuwirken, wurden die Flaschen, in denen die Suspensionen angesetzt wurden, stark geschüttelt und mit einem Glasstab durchgerührt, um die Klumpen zu beseitigen. Bei den *Chlorella*- Suspensionen verschwand der Schaum nach ein paar Minuten, während er bei *Spirulina* bestehen blieb. Auch die Klumpen lösten sich bei dieser Alge nicht, während die *Chlorella*- Pulver sich vollständig im Wasser lösten. Dadurch kam es beim Aufteilen auf die Erlenmeyerkolben für die verschiedenen Temperaturbehandlungen zu Verlusten, da einige Klumpen der *Spirulina*- Suspension in den Flaschen zurückblieben. Auch nach dem Zentrifugieren bereitete dieser Algenstamm Probleme, da sich der Überstand bei den 40 °C Extrakten nicht gut vom Rückstand trennen ließ und beim Abgießen des Überstandes ein wenig des sehr flüssigen Rückstandes mit überführt wurde. Bei *Chlorella* trat dieses Problem nicht auf, die Trennung der beiden Phasen war sehr gut und das Extrakt ließ sich leicht abgießen, während das Pellet im Zentrifugenröhrchen zurückblieb.

Nach der Behandlung bei 70 °C war die Trennung auch bei *Spirulina* schon etwas besser durchzuführen, trotzdem ging auch hier etwas vom Rückstand mit in die Extrakte über. Nach der 90 °C heißen Erwärmung ließ sich auch das *Spirulina*- Extrakt sehr gut abtrennen. Die Ausbeute an Extrakt war generell bei *Chlorella* sehr viel höher, da bei *Spirulina* mehr Rückstand vorhanden war, welcher verworfen wurde. Dies kann man im folgenden Bild gut erkennen.



Abbildung 3: Vergleich Rückstand beider Algen

Auf der linken Seite in Abbildung 3 sieht man das Zentrifugenröhrchen mit dem Rückstand eines *Chlorella*- Extraktes nach 70 °C und rechts den Rückstand eines 70 °C *Spirulina*- Extraktes. Nicht nur bei der Trennwirkung ließ sich ein Unterschied bei den verschiedenen Temperaturbehandlungen erkennen, auch die Farbe der Extrakte veränderte sich mit zunehmender Temperatur. Während die Farbe der Extrakte nach 40 °C noch sehr intensiv und grün- bläulich war, ließ die Intensität der Färbung über 70 °C zu 99 °C nach. Bei *Chlorella* war dieser Unterschied nicht so groß, da die Färbung von Anfang an nicht ganz so intensiv war wie bei *Spirulina*. Letztere hatte vor der Wärmebehandlung und auch nach 40 °C eine sehr blaue Färbung, die dann mit steigender Temperatur verschwand.



Abbildung 4: Farbvergleich Spirulina bei drei Temperaturen

In Abbildung 4 ist der Unterschied gut zu erkennen. Alle drei Extrakte enthalten das gleiche Replikat der *Spirulina* Alge, wobei links das Extrakt der 40 °C Behandlung, in der Mitte das der 70 °C und rechts das der 99 °C Behandlung aufgeführt ist. Das 40 °C Extrakt hat eine intensive blaue Färbung und während das 70 °C Extrakt noch einen leichten Blaustich aufweist, ist das 99 °C Extrakt eher grün- braun.

4.2 pH- Wert- Messung

Nachdem das pH- Meter kalibriert wurde, wurde bei jedem Extrakt eine Dreifachbestimmung durchgeführt, welche zu folgenden Werten führte:

Tabelle 5: pH- Werte

Probe	1. Messung	2. Messung	3. Messung	Durchschnitt	Standard- abweichung
C1 40	7,16	7,13	7,17	7,15	0,017
C2 40	7,11	7,12	7,11	7,11	0,005
C3 40	7,13	7,1	7,11	7,11	0,012
S1 40	6,5	6,48	6,51	6,50	0,012
S2 40	6,43	6,43	6,44	6,43	0,005
S3 40	6,5	6,52	6,52	6,51	0,009
C1 70	7,2	7,17	7,18	7,18	0,012
C2 70	7,18	7,18	7,18	7,18	0,000
C3 70	7,18	7,17	7,16	7,17	0,008
S1 70	6,65	6,63	6,61	6,63	0,016
S2 70	6,55	6,57	6,57	6,56	0,009
S3 70	6,55	6,57	6,57	6,56	0,009
C1 99	7,22	7,22	7,22	7,22	0,000
C2 99	7,22	7,23	7,22	7,22	0,005
C3 99	7,23	7,23	7,22	7,23	0,005
S1 99	6,47	6,45	6,45	6,46	0,009
S2 99	6,44	6,45	6,45	6,45	0,005
S3 99	6,44	6,44	6,45	6,44	0,005
Neg. Ko	6,98	6,86	6,99	6,94	0,059

Wie der Tabelle 5 zu entnehmen ist, lag der pH- Wert der *Chlorella*- Extrakte im neutralen Bereich, während die *Spirulina*- Extrakte einen leicht sauren pH- Wert aufwiesen. Die Werte der *Chlorella*- Extrakte stiegen mit steigender Temperatur leicht an, während die der *Spirulina*- Extrakte etwa gleich blieben. Möglicherweise enthielten die *Chlorella*- Suspensionen Stoffe, welche erst bei höheren Temperaturen in Lösung gingen und den pH- Wert in Richtung basisch veränderten. Die Steigung der Werte könnte jedoch auch auf Messfehler zurückzuführen sein oder mit der Raumtemperatur zusammenhängen, da die Proben, welche zuletzt gemessen wurden, nahezu Raumtemperatur aufwiesen, während die ersten Proben direkt aus der Kühlung kamen. Da sich dies aber nur bei *Chlorella* zeigte und bei *Spirulina* nicht, ist die erste Möglichkeit wahrscheinlicher. Der letzte Wert ist der der mitgeführten Negativ- Kontrolle, welcher mit circa 7 im erwarteten Bereich lag.

4.3 Trockensubstanzmessung

Die Trockensubstanz wurde mittels Schnellfeuchtebestimmer gemessen. Eine Messung dauerte circa 4 bis 5 min und alle Proben wurden drei Mal gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt, wobei der Durchschnitt das arithmetische Mittel angibt.

Tabelle 6: Trockensubstanz- Werte

Probe	1. Messung	2. Messung	3. Messung	Durchschnitt	Standardabweichung
C1 40	1,15	1,16	0,95	1,09	0,097
C2 40	1,19	1,06	1,18	1,14	0,059
C3 40	1,08	1,3	1,12	1,17	0,096
S1 40	3,05	3,03	3,2	3,09	0,076
S2 40	3,81	4	3,84	3,88	0,083
S3 40	3,37	3,41	3,55	3,44	0,077
C1 70	1,31	1,33	1,25	1,30	0,034
C2 70	1,44	1,2	1,34	1,33	0,098
C3 70	1,48	1,47	1,32	1,42	0,073
S1 70	2,43	2,34	2,19	2,32	0,099
S2 70	2,42	2,61	2,5	2,51	0,078
S3 70	2,22	2,11	2,34	2,22	0,094
C1 99	1,53	1,34	1,55	1,47	0,095
C2 99	1,54	1,47	1,46	1,49	0,036
C3 99	1,47	1,47	1,46	1,47	0,005
S1 99	3,53	3,43	3,47	3,48	0,041
S2 99	3,25	3,11	3,21	3,19	0,059
S3 99	3,25	2,95	3,02	3,07	0,128
Neg. Ko	0	0	0	0,00	0,000

Die Trockensubstanz der Negativkontrolle lag wie erwartet bei 0 %. Die Trockensubstanz der *Chlorella*- Extrakte stieg mit steigender Temperatur der Wärmebehandlung bei der Extraktion an, während die Trockensubstanz der *Spirulina*- Extrakte von 40 °C zu 70 °C sank und zu 99 °C wieder anstieg. Die folgenden Diagramme verdeutlichen dies bildlich.

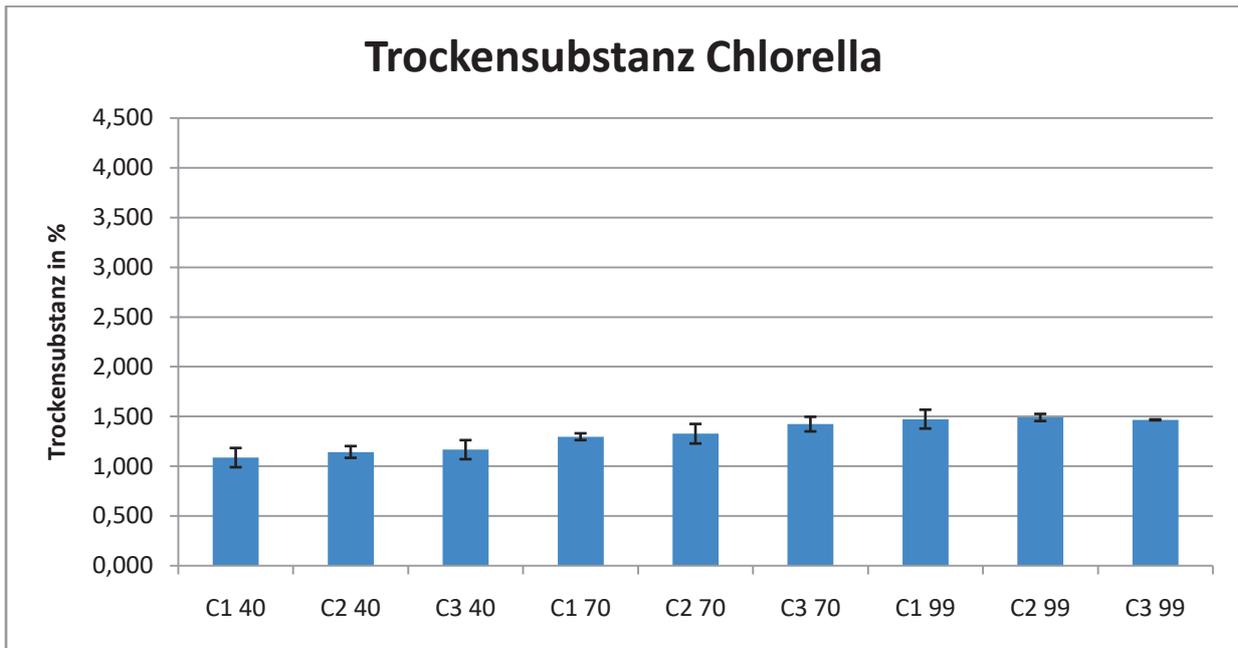


Abbildung 5: Trockensubstanz Chlorella

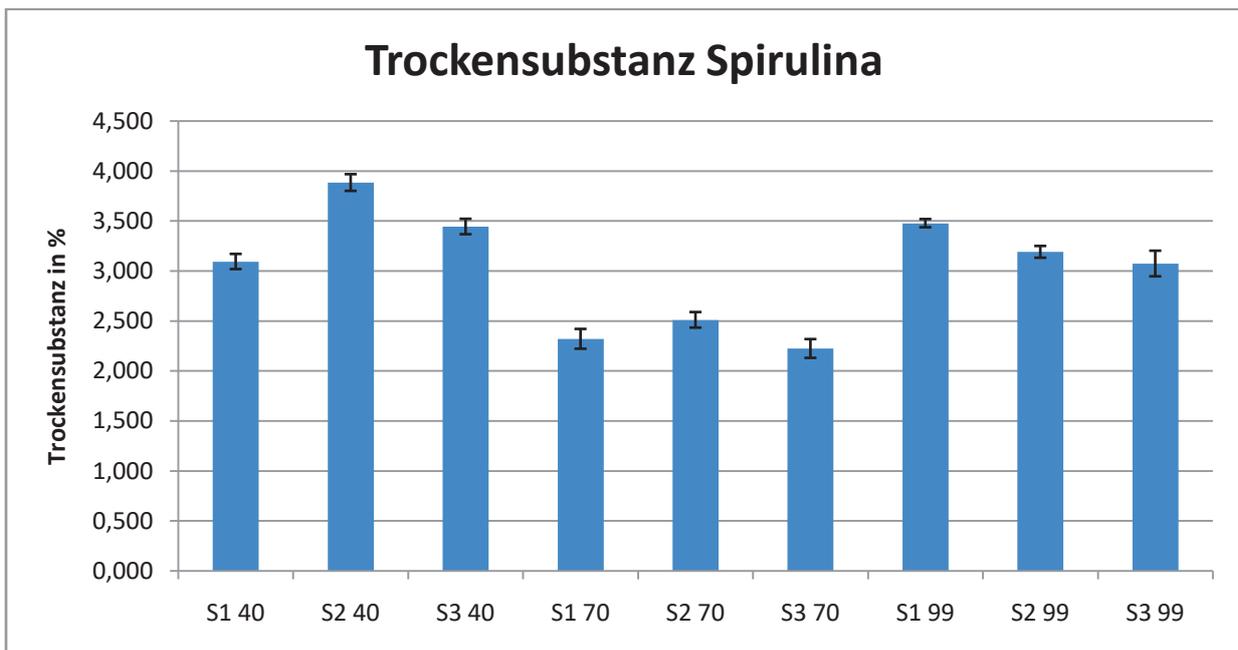


Abbildung 6: Trockensubstanz Spirulina

Man erkennt sofort, dass die Trockensubstanz von *Spirulina* höher als die der *Chlorella*-Extrakte war. Außerdem erkennt man das bereits erwähnte Muster der Steigung der Trockenmasse bei *Chlorella* mit der Temperatur, sowie das Sinken und Steigen der Trockenmasse bei *Spirulina*. Anhand der eingezeichneten Standardabweichungen wird ersichtlich, dass die Streuung der einzelnen drei Messungen sehr gering war, die Werte also nah

am arithmetischen Mittel lagen und somit eine hohe Aussagekraft besaßen.

Eine mögliche Ursache für die Steigung der *Chlorella*- Trockensubstanz mit steigender Temperatur könnte der erfolgreichere Aufschluss der Substanzen sein. Bei den Schwankungen der *Spirulina*- Trockensubstanz könnten die Verluste an Biomasse beim Herstellen der Suspensionen ursächlich sein.

4.4 Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes

Bei den Messungen der Extinktionen der Extrakte ergaben sich folgende Werte:

Tabelle 7: Extinktionen der Extrakte

Probe	1. Messung	2. Messung	Durchschnitt	Standardabweichung
C1 40	0,153	0,146	0,150	0,004
C2 40	0,148	0,146	0,147	0,001
C3 40	0,147	0,146	0,147	0,001
S1 40	0,299	0,301	0,300	0,001
S2 40	0,338	0,328	0,333	0,005
S3 40	0,301	0,293	0,297	0,004
C1 70	0,141	0,143	0,142	0,001
C2 70	0,141	0,144	0,143	0,002
C3 70	0,145	0,146	0,146	0,001
S1 70	0,155	0,163	0,159	0,004
S2 70	0,157	0,157	0,157	0,000
S3 70	0,159	0,151	0,155	0,004
C1 99	0,148	0,151	0,150	0,002
C2 99	0,146	0,147	0,147	0,001
C3 99	0,147	0,15	0,149	0,002
S1 99	0,257	0,258	0,258	0,001
S2 99	0,247	0,254	0,251	0,004
S3 99	0,244	0,248	0,246	0,002
Neg. KO	0,08	0,081	0,081	0,001

Aufgrund des zeitlich hohen Aufwandes bei der Durchführung und der Tatsache, dass nicht mehr als sechs bis acht Proben auf einmal behandelt werden konnten, wurde bei diesen Bestimmungen nur eine Doppelbestimmung anstelle einer Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Standardabweichung war auch hier sehr gering, die Streuung der Ergebnisse beider Messungen also klein, wie man in Tabelle 7 erkennen kann. Die Extinktion der Negativkontrolle war, wie schon der Blindwert bei der Kalibrierreihe, recht hoch. Da die Negativkontrolle aus Wasser bestand und die nachfolgenden Berechnungen auch die Verdünnungen mit Wasser einbeziehen, wurde die Negativkontrolle aus den Berechnungen ausgenommen.

Die niedrigen Extinktionswerte bei den Proben S1 70, S2 70 und S3 70 im Vergleich zu den übrigen Werten bei *Spirulina* kamen durch eine stärkere Verdünnung bei diesen drei Proben zustande, da zunächst von einer früher angefertigten Kalibrierreihe ausgegangen wurde, bei welcher die Werte von *Spirulina* außerhalb des Kalibrierbereichs lagen, weshalb diese drei Proben bei den Folgeversuchen 1/4 verdünnt wurden, statt 1/2. Da dies bei der finalen

Kalibrierung nicht der Fall war, wurden alle folgenden Proben wieder nur 1/2 verdünnt, was für die nachfolgenden Berechnungen jedoch keine Nachteile hatte, da die Verdünnungsfaktoren in diese mit einfließen. Ausgehend von den gemessenen Werten wurde anschließend mit Hilfe der Kalibrierfunktion die vorläufige Polyphenolkonzentration in mg/ l berechnet. Die Rechnung wird am Beispiel von C1 40 erklärt.

$$y = 0,0032x - 0,1646$$

In diese Kalibrierfunktion wurde die gemessene Extinktion als y- Wert eingesetzt und die Formel nach x umgestellt, um die Konzentration zu erhalten.

$$0,150 = 0,0032 * x - 0,1646 \quad | +0,1646$$

$$0,3146 = 0,0032 * x \quad | /0,0032$$

$$98,3125 = x$$

Für das Extrakt C1 40 ergibt sich also durch Einsetzen in die Kalibrierfunktion eine Konzentration von 98,31 mg/ l.

Da jedoch bei der Kalibrierfunktion die Lösungen unverdünnt gemessen wurde, während die Proben zuerst 1/2 verdünnt wurden und anschließend 100 µl auf 8,5 ml aufgefüllt wurden, müssen diese beiden Verdünnungsfaktoren noch dazu multipliziert werden. Durch die Verdünnung von 100 µl auf 8,5 ml, also 8500 µl, entstand ein Verdünnungsfaktor von 85. Daraus resultierten folgende Ergebnisse für die Gesamtkonzentration an Polyphenolen in mg/ l in den einzelnen Extrakten:

Tabelle 8: Gesamtgehalt an Polyphenolen in mg/ l

Probe	Polyphenolkonzentration in mg/ l
C1 40	16686,563
C2 40	16553,750
C3 40	16527,188
S1 40	24681,875
S2 40	26435,000
S3 40	24522,500
C1 70	16288,125
C2 70	16314,688

C3 70	16474,063
S1 70	34382,500
S2 70	34170,000
S3 70	33957,500
C1 99	16686,563
C2 99	16527,188
C3 99	16633,438
S1 99	22424,063
S2 99	22052,188
S3 99	21813,125

Da der Gehalt an Polyphenolen in mg Gallussäureequivalente pro g Algentrockenmasse angegeben wird, wurde die Trockensubstanz noch in die Rechnung mit einbezogen, indem der Wert in mg/ l durch die Trockenmasse in g/ l geteilt wurde, sodass ein Gesamtpolyphenolgehalt in mg/ g herauskam.

Für das Beispiel C1 40, welches eine Trockenmasse von 10,87 g/ l aufwies, ergab sich daraus ein Wert von **1535,10 mg/ g**.

Dieser Wert, sowie die Werte aller Extrakte, welche im Anhang aufgelistet sind, ergaben mathematisch keinen Sinn, da es einem Gehalt von über 100 % entsprechen würde. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass die Methode, so wie sie durchgeführt wurde, nicht für diese Extrakte geeignet war. Aus diesem Grund wurde ein erneuter Versuch unternommen, wobei die Methode etwas angepasst wurde.

Zuerst wurde wieder eine Gallussäure- Stammlösung hergestellt. Diesmal jedoch wurde in die Berechnung der Wasseranteil des Gallussäure- Monohydrates mit einbezogen, um dies als mögliche Fehlerquelle auszuschließen. Die Molare Masse von Gallussäure beträgt 170,12 g/ mol, während die Molare Masse des Gallussäure- Monohydrates bei 188,14 g/ mol liegt. Es sollte eine Stammlösung von 1000 mg/ l hergestellt werden, dies entspricht 100 mg/ 100 ml. Um herauszufinden, wie viel mg des Monohydrates eingewogen werden muss, wurde eine Verhältnisgleichung aufgestellt.

$$\frac{188,14 \text{ g/mol}}{x \text{ mg}} = \frac{170,12 \text{ g/mol}}{100 \text{ mg}}$$

Wenn 100 mg der wasserfreien Gallussäure eingewogen werden müssen, müssen von dem Monohydrat demnach 110,6 mg auf 100 ml eingewogen werden.

Aus der entstandenen Gallussäure- Stammlösung mit der Konzentration 1000 mg/ l, wurden diesmal zuerst die einzelnen Standards in 100 ml Messkolben und nicht direkt in den Küvetten angesetzt. Dies sollte das Pipettieren mit sehr geringen Mengen als Fehlerquelle ausschließen, da Pipettierfehler bei so kleinen Mengen schnell zu sehr hohen Abweichungen führen können. Es wurden sechs Standards angesetzt, das Pipettierschema ist der Tabelle 9 zu entnehmen.

Tabelle 9: Pipettierschema Gallussäure- Kalibrierreihe Ansatz 2

Konzentration in mg/ l	Menge der Stammlösung in ml	Menge an Wasser in ml
0	0	100
10	1	99
50	5	95
100	10	90
200	20	80
300	30	70

Anschließend wurde von dem FCR eine 10 % -ige Verdünnung hergestellt (in Anlehnung an die Anleitung der Hochschule für die Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes in Schokolade). Von den hergestellten Standards wurden anschließend, wie im ersten Durchlauf, 100 µl in eine Küvette pipettiert und mit 500 µl der FCR- Lösung versetzt. Mit Rührstäben wurden die Standards durchmischt und für 3 min inkubiert. Anschließend wurde je 1 ml gesättigte Natriumcarbonatlösung dazugegeben, wieder gemischt, für 1 h im Dunkeln inkubiert und im Anschluss im Photometer bei 720 nm gemessen. Diese Kalibrierung ergab folgende Werte.

Tabelle 10: Kalibrierwerte Ansatz 2

Konzentration in mg/ l	Extinktion bei 720 nm
0	0,081
10	0,180
50	0,381
100	0,696
200	1,298
300	1,831

Aus diesen Werten entstand folgende Kalibriergerade.

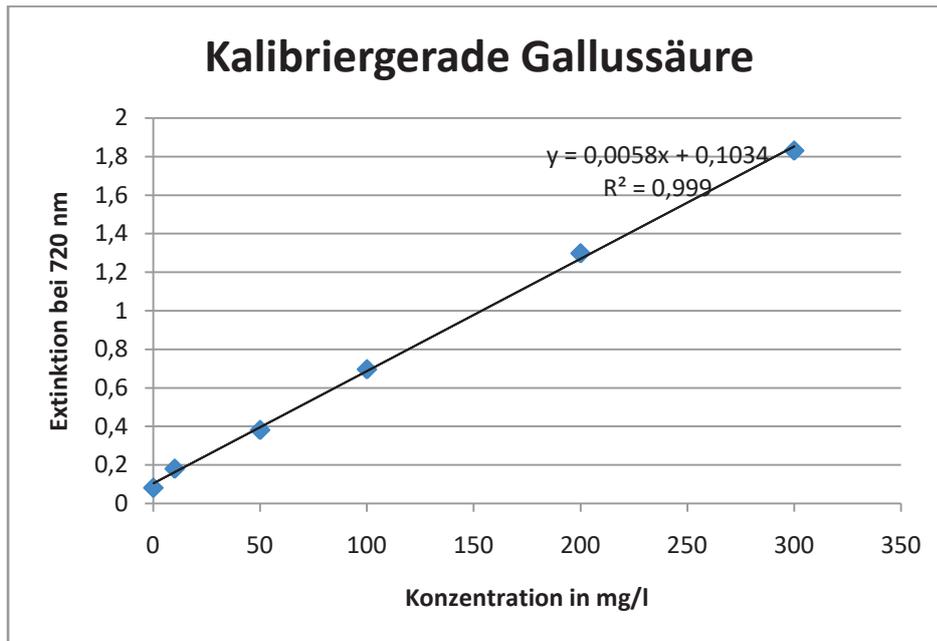


Abbildung 7: Kalibriergerade Gallussäure Ansatz 2

Anhand des Bestimmtheitsmaßes von 0,999 erkennt man, dass die entstandene Funktion nahezu linear war. Die lineare Formel lautete diesmal

$$y = 0,0058x + 0,1034$$

Nach der Kalibrierung wurde wegen des zeitlich hohen Aufwandes der Methode von jedem Algenreplikate eines ausgewählt, da der erste Ansatz zeigte, dass die Unterschiede der Extinktionen zwischen den einzelnen Replikaten nicht groß waren. Um eine bessere Auswertbarkeit zu gewährleisten, wurde jede Probe wieder per Doppelbestimmung gemessen. Außerdem wurden von jeder Probe drei verschiedene Vorverdünnungen hergestellt, was ein breiteres Spektrum bei den Extinktionen und bessere Vergleichsmöglichkeiten ergab. Dazu wurden je eine 1/10, eine 1/5 und eine 1/2 Verdünnung in Reagenzgläsern auf 10 ml angesetzt. Es wurden die Extrakte C2 40, S1 40, C2 70, S2 70, C3 99 und S2 99 gewählt, da diese jeweils dem Durchschnitt der Extinktionen in Ansatz 1 der drei Replikate am nächsten kamen.

Von diesen Vorverdünnungen wurden auch hier jeweils 100 µl in eine Küvette pipettiert, mit 500 µl 10 % -iger FCR- Lösung versetzt, gemischt und 3 min inkubiert, dann mit 1 ml Natriumcarbonatlösung versetzt, gemischt und 1 h im Dunkeln stehen gelassen. Nachdem die Proben wieder im Photometer bei 720 nm gemessen wurden, ergab sich, dass die Extinktionen der 1/2- Verdünnungen im mittleren Bereich der Kalibriergeraden lagen, während die beiden anderen Verdünnungen eher Werte im unteren Bereich der Kalibrierung ergaben,

sodass für die folgenden Berechnungen die 1/2 Verdünnung genutzt wurde. Die gemessenen und berechneten Werte aller Verdünnungen sind im Anhang aufgelistet.

Tabelle 11: Polyphenolgehalt Ansatz 2

Probe	Extinktion	VF	c in mg/l	TS in g/l	Gehalt in mg/g	Durchschnitt in mg/g	Standardabweichung
C2 40	0,684	2	200,207	11,430	17,516	14,077	3,439
C2 40	0,456	2	121,586	11,430	10,637		
C2 70	0,35	2	85,034	13,270	6,408	6,304	0,104
C2 70	0,342	2	82,276	13,270	6,200		
C3 99	0,342	2	82,276	14,670	5,608	5,738	0,129
C3 99	0,353	2	86,069	14,670	5,867		
S1 40	1,002	2	309,862	30,930	10,018	8,558	1,460
S1 40	0,74	2	219,517	30,930	7,097		
S2 70	0,791	2	237,103	25,100	9,446	11,404	1,958
S2 70	1,076	2	335,379	25,100	13,362		
S2 99	0,798	2	239,517	31,900	7,508	7,735	0,227
S2 99	0,84	2	254,000	31,900	7,962		

In Tabelle 11 sind die Extinktionen der Proben angegeben, wobei die zweite Zeile derselben Probe immer den Messwert aus der zweiten Messung, also der Doppelbestimmung, darstellt. Die Abkürzung VF steht für den Verdünnungsfaktor, c in mg/l gibt die berechnete Konzentration der Polyphenole an und TS in g/l kennzeichnet die Trockensubstanz des betreffenden Extraktes. Um aus den Extinktionswerten die Konzentration an Polyphenolen zu berechnen, wurden die Extinktionen wieder in die Kalibriergleichung eingesetzt und diese nach x aufgelöst. Dies wird am Beispiel der ersten Messung des Extraktes C2 40 veranschaulicht.

$$0,684 = 0,0058x + 0,1034 \quad | - 0,1034$$

$$0,5806 = 0,0058x \quad | /0,0058$$

$$100,10 = x$$

Dieser Wert von 100,10 mg/ l muss anschließend noch mit dem Verdünnungsfaktor, in diesem Fall 2, multipliziert werden, was 200,2 mg/ l ergibt. Anschließend wurde dieser Wert wieder durch die Trockensubstanz in g/ l (11,43 g/ l) geteilt, sodass sich ein Endgehalt von **17,516 mg/ g** ergibt.

Der Polyphenolgehalt liegt damit circa zwischen 5 und 18 mg/ g. Der Durchschnitt in Form des arithmetischen Mittels wurde aus den beiden Werten der Doppelbestimmung ermittelt, ebenso die dazugehörige Standardabweichung.

In den Diagrammen in Abbildung 8 und 9 sind die Werte veranschaulicht.

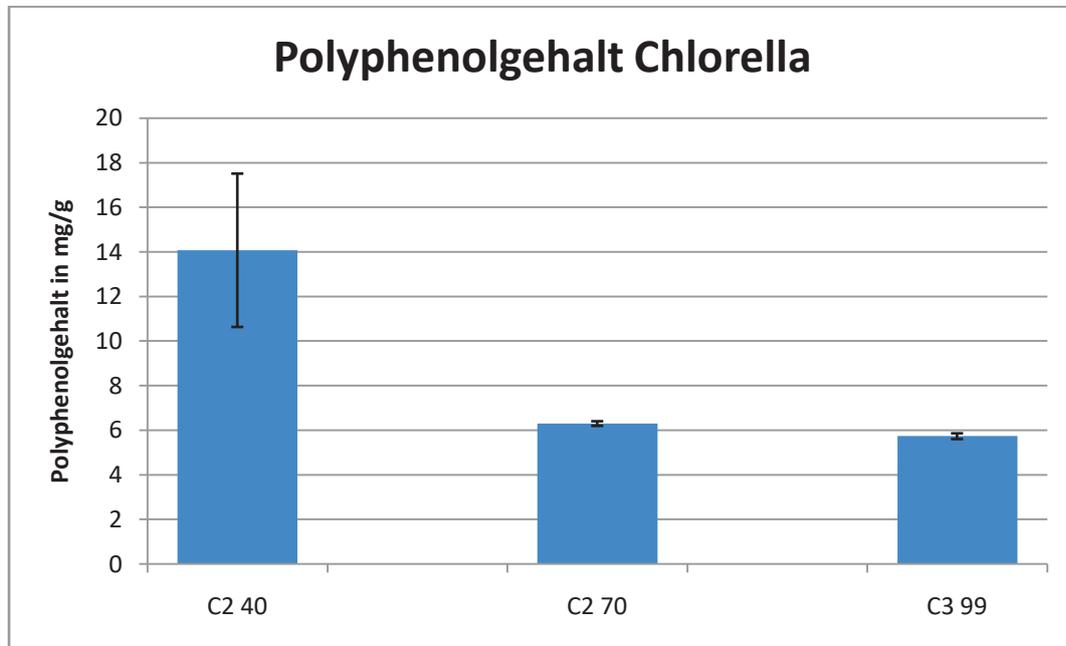


Abbildung 8: Polyphenolgehalt Chlorella

Bei beiden Diagrammen wurde jeweils der Mittelwert der Doppelbestimmung aufgetragen. Die Standardabweichung war bei den Messungen des Extraktes von C2 40 sehr hoch, da die Extinktionen sich bei den Messungen sehr unterschieden, sodass mit den Werten von 17,516 mg/ g und 10,637 mg/ g eine recht hohe Abweichung vom Mittelwert entstand. Diese Schwankungen könnten auf Pipettier- oder Messfehler zurückzuführen sein. Es lässt sich bei *Chlorella* eine absteigende Tendenz erkennen mit zunehmender Temperatur bei der Extraktion. Auch wenn man die Standardabweichung bei C2 40 von dem Wert abziehen würde, läge dieser immer noch höher als die beiden anderen bei 70 und 99 °C. Es ist also eine Senkung des Polyphenolgehaltes mit steigender Temperatur zu erkennen.

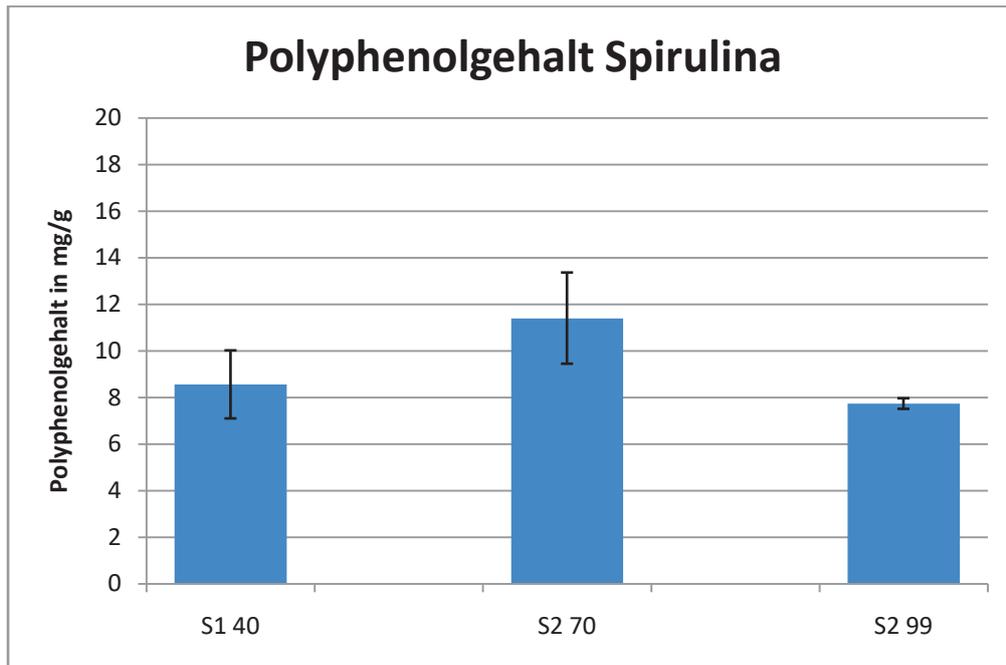


Abbildung 9: Polyphenolgehalt Spirulina

Die Standardabweichungen bei den Polyphenolgehalten bei Spirulina lag generell etwas höher als bei *Chlorella*, besonders bei den Extrakten S1 40 und S2 70. Aus dem Diagramm in Abbildung 9 ist zu erkennen, dass der Polyphenolgehalt bei den 70 °C Extrakten hier am höchsten lag.

4.5 Untersuchung der antibakteriellen Wirkung

4.5.1 Versuch 1

Der Hemmhoftest ließ sich ohne Komplikationen durchführen und die Platten konnten nach einer Inkubation von zwei Tagen bei 37 °C ausgewertet werden. Die Aufteilung der einzelnen Platten ist in Abbildung 10 zu sehen.

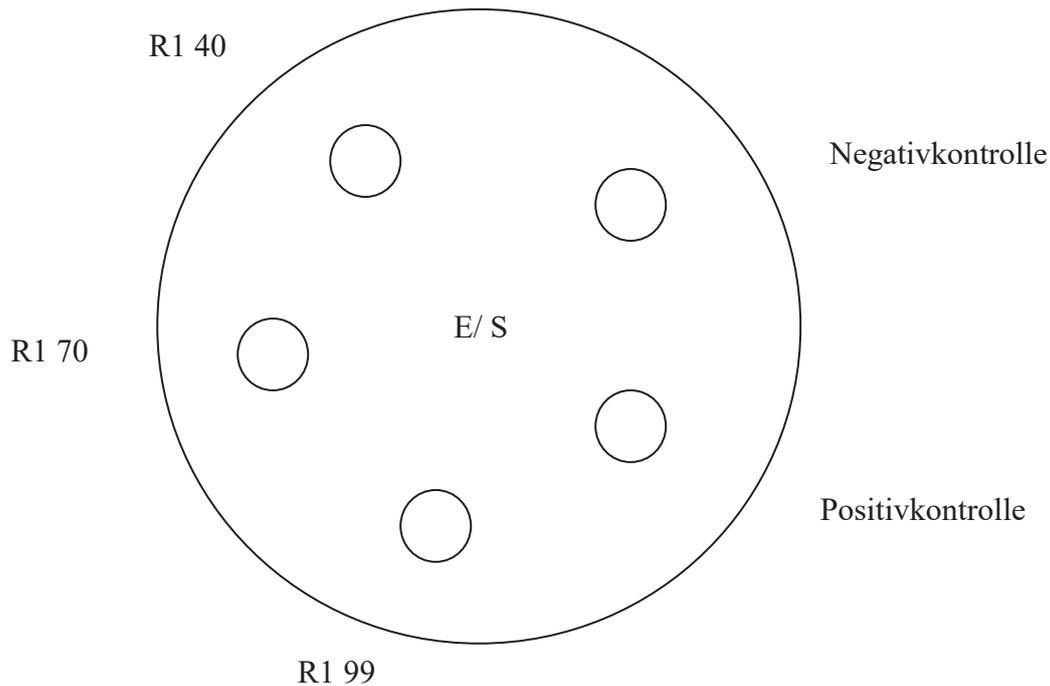


Abbildung 10: Plattenbelegung

Jede der 12 Platten wurde nach diesem Schema aufgeteilt. Oben links befand sich das Extrakt, welches bei 40 °C behandelt wurde, darunter das der 70 °C Behandlung, ganz unten das der 99 °C Behandlung, wobei alle drei Extrakte immer zum selben Replikat (R) gehörten, also zum Beispiel C1 40, C1 70 und C1 99. Unten rechts befand sich das Plättchen mit dem Polymyxin B, welches als Positivkontrolle fungierte und darüber oben rechts die Negativkontrolle, welche die bei den Versuchen mitgeführte Wasserprobe enthält. Die Platten, welche mit *E. coli* beschichtet waren, waren mit E beschriftet, die Platten mit *Staph. epidermidis* mit S. Als Beispiel ist in Abbildung 11 eine der Platten vor der Inkubation zu sehen.



Abbildung 11: Platte E2 vor Inkubation

Die Abbildung 11 zeigt die Platte mit dem zweiten *Chlorella*- Replikat und *E. coli* als Beschichtung, weshalb die Platte mit E2 beschriftet ist, also *E. coli* und Replikat 2. Dadurch, dass der Boden der Platten beschriftet ist, ist die Beschriftung spiegelverkehrt zu sehen. Die Aufteilung ist genauso wie in Abbildung 10 erklärt, was gut an dem Aufdruck auf dem Polymyxin B- Plättchen zu erkennen ist. Demnach enthält Platte E3 *Chlorella*- Replikat 3. Die Platte E4 beinhaltet Replikat 1, E5 Replikat 2 und E6 Replikat 3 von *Spirulina*. Das Gleiche gilt für die Platten mit *Staph. epidermidis*. Um dies zu veranschaulichen ist die Belegung in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Plattenbenennung

Plattenname	Aufgetragene Extrakte
E1	C1 40, C1 70, C1 99
E2	C2 40, C2 70, C2 99
E3	C3 40, C3 70, C3 99
E4	S1 40, S1 70, S1 99
E5	S2 40, S2 70, S2 99
E6	S3 40, S3 70, S3 99
S1	C1 40, C1 70, C1 99
S2	C2 40, C2 70, C2 99
S3	C3 40, C3 70, C3 99

S4	S1 40, S1 70, S1 99
S5	S2 40, S2 70, S2 99
S6	S3 40, S3 70, S3 99

Nach der Inkubationszeit war ein deutlicher Unterschied auf den Platten zu erkennen.



Abbildung 12: Platte E2 nach Inkubation

In Abbildung 12 erkennt man die Platte E2 nach der Inkubationszeit. Man erkennt im Unterschied zu Abbildung 11 eine deutliche Trübung der Oberfläche durch das Wachstum der Bakterienkultur, wodurch die Plattenbeschriftung nicht mehr zu sehen ist. Außerdem fällt sofort ins Auge, dass sich viele kleine weiße Punkte auf der Oberfläche des Rasens befinden, was auf eine Fremdverkeimung hindeutet. Trotzdem ist sofort eine deutliche Hemmung des Bakterienwachstums um das Polymyxin-Plättchen herum zu erkennen. Zwar ist der Hemmhof ebenfalls von den weißen Punkten übersät, jedoch lässt sich darunter eine klare kreisförmige Abgrenzung erkennen, die auf die Hemmung des Wachstums schließen lässt. Jedoch findet sich

dieser Hemmhof ausschließlich um die Positivkontrolle herum, nicht jedoch um die Extrakte. Auch um die Negativkontrolle herum ist wie erwartet nichts zu erkennen, was in diesem Fall aber für das Funktionieren des Testes spricht.

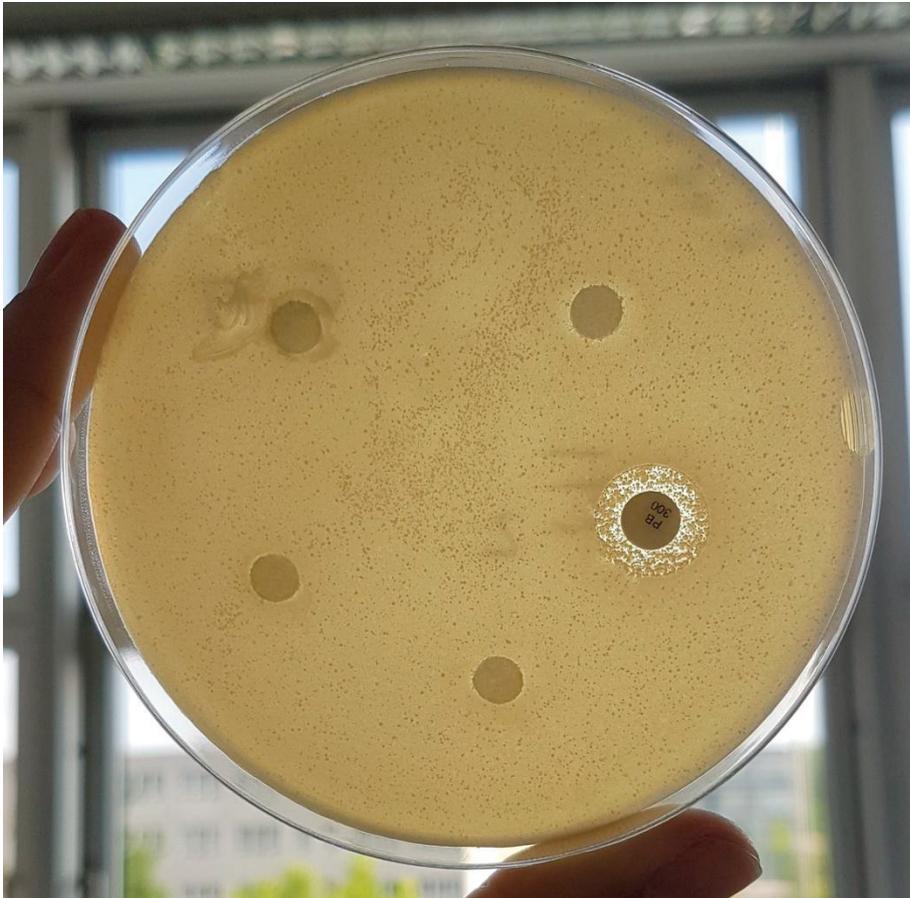


Abbildung 13: Platte E2 gegen das Licht fotografiert

In Abbildung 13 wurde dieselbe Platte gegen das Licht fotografiert, wodurch man den entstandenen Hemmhof besser sehen kann. Da die Fremdverkeimung offenbar nicht durch das Antibiotikum gehemmt wurde, handelt es sich vermutlich um einen Pilz oder eine anderes Bakterium.

Nichtsdestotrotz ist die Platte auswertbar und zeigt, dass der Test funktioniert hat. Auch bei den Platten E1 und E3 zeigte sich das gleiche Bild. In Abbildung 14 ist Platte E5 zu sehen, also wieder eine Platte mit *E. coli*, jedoch in diesem Fall mit den Extrakten des zweiten Replikates von *Spirulina*.

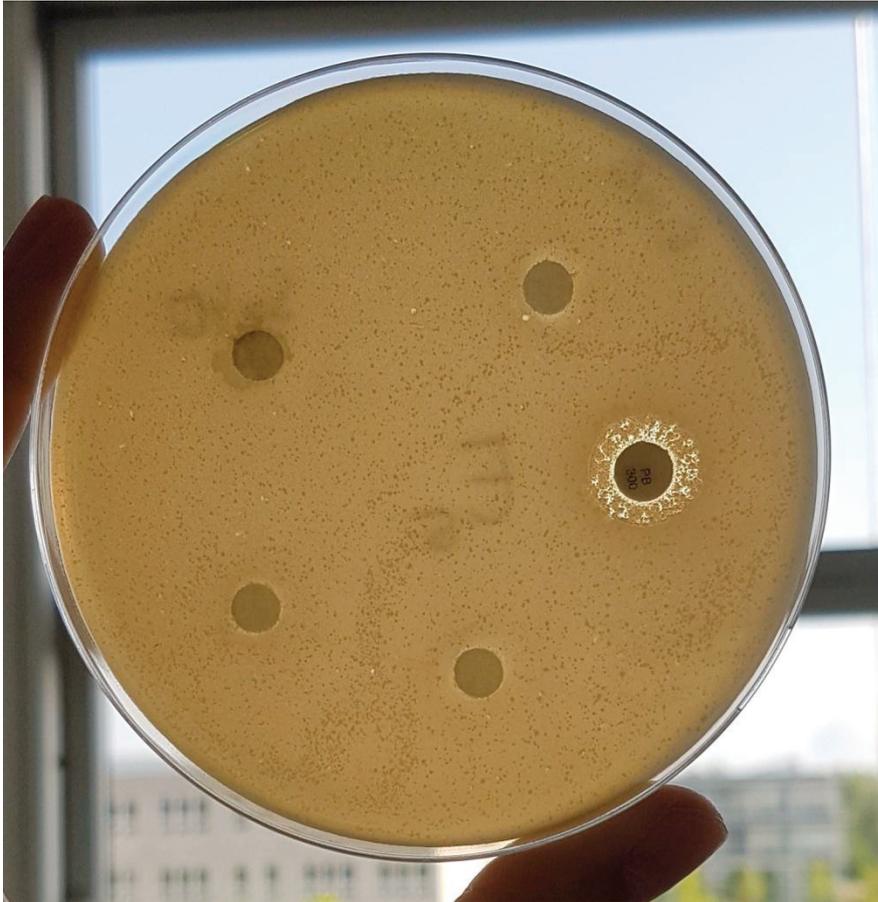


Abbildung 14: Platte E5 nach Inkubation

Auch bei dieser Platte erkennt man dieselbe Wirkung wie bei der Platte E2 mit den *Chlorella*-Extrakten. Auch bei *Spirulina* hatte ausschließlich das Polymyxin B eine hemmende Wirkung auf die *E. coli*-Kultur.

Die Platten, welche mit *Staph. epidermidis* beschichtet waren, zeigten ein etwas anderes Ergebnis.

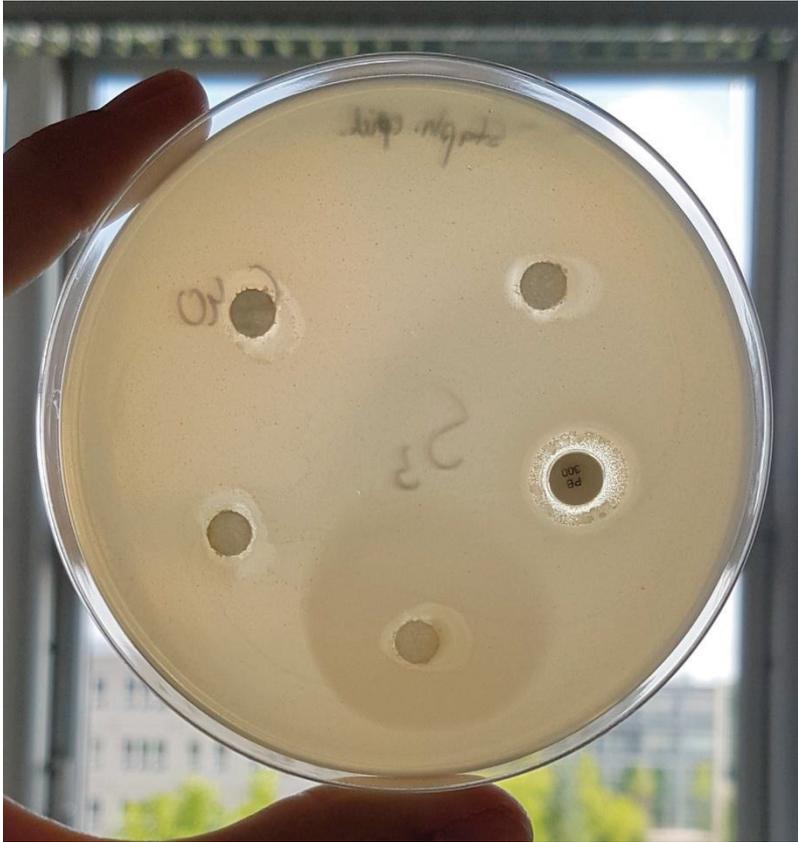


Abbildung 15: Platte S3 nach Inkubation

In Abbildung 15 ist Platte S3 zu sehen, welche die Extrakte des dritten *Chlorella*- Replikates enthielt. Auch hier ist ein Hemmhof um das Polymyxin B zu erkennen, jedoch nicht so klar abgegrenzt wie bei den anderen Platten. Außerdem ist auf dieser Platte keine Fremdverkeimung in Form der Pünktchen zu finden. Um die Extrakte scheint die Kultur etwas verschwommener auszusehen, man könnte dies für eine eventuelle Hemmung halten, wäre dies nicht auch bei der Negativkontrolle zu sehen.



Abbildung 16: Platte S2 nach Inkubation



Abbildung 17: Platte S4 nach Inkubation

In der Abbildung 16 ist das Ergebnis von Platte S2 zu erkennen. Diese Platte enthielt die Extrakte von *Chlorella*- Replikat zwei. Der Hemmhof um die Positivkontrolle ist nur sehr schwach zu sehen. Um die Extrakte und die Negativkontrolle ist keine Hemmung zu erkennen. In Abbildung 17 ist Platte S4 zu sehen, welche die Extrakte von *Spirulina*- Replikat eins enthielt. Auch hier ist der Hemmhof um die Positivkontrolle zu sehen, jedoch nicht so stark wie bei den *E. coli*- Platten. Auch um die anderen Plättchen scheint auf dieser Platte ein Unterschied sichtbar zu sein. Da dies aber auch hier bei der Negativkontrolle auftritt, kann es sich nicht um einen Hemmhof handeln.

4.5.2 Versuch 2

Da die Hemmhöfe um das Polymyxin B bei den *Staph. epidermidis*- Platten nicht so klar abgegrenzt und sichtbar waren wie bei den *E. coli*- Platten wurde der Test nochmal wiederholt, wobei auf die *Staph. epidermidis*- Platten zusätzlich zum Polymyxin B auch noch ein anderes Antibiotikum, nämlich Ampicillin, als Positivkontrolle aufgebracht wurde. Außerdem wurde in den Weichagar 100 μ l der entsprechenden Bakterienkultur gegeben anstelle von 500 μ l, da der Rasen sehr dicht war und man durch weniger Kultur eventuell die Hemmhöfe besser erkennen kann.

Die Belegung der *E. coli*- Platten wurde genauso wie im ersten Versuch durchgeführt, die Belegung der *Staph. epidermidis*- Platten wurde wie folgt verändert:

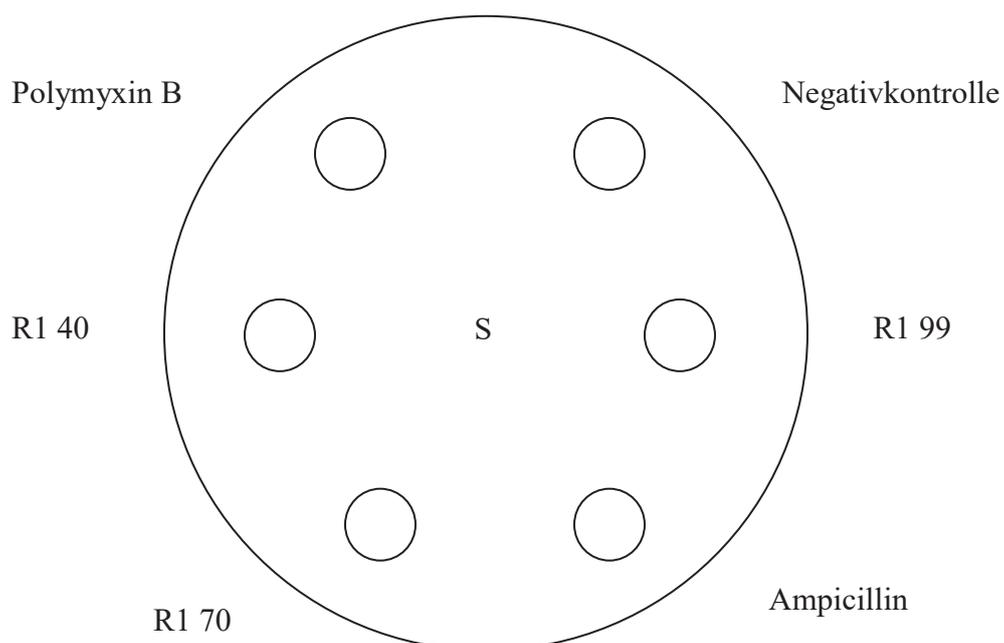


Abbildung 18: Plattenbelegung mit Ampicillin

In Abbildung 18 ist die Plattenbelegung der *Staph. epidermidis*- Platten des zweiten Versuches aufgezeigt. Die Belegung unterschied sich sehr von den vorherigen Platten mit fünf Plättchen anstelle der nun sechs Plättchen, da sich in diesem Fall die beiden Positivkontrollen gegenüber liegen sollten, da man vorher nicht einschätzen kann, wie groß ein Hemmhof wird. In dem folgenden Bild in Abbildung 19 sind zwei Platten aus dem zweiten Versuch vor der Inkubation zu sehen, die die eben beschriebene Belegung veranschaulichen.

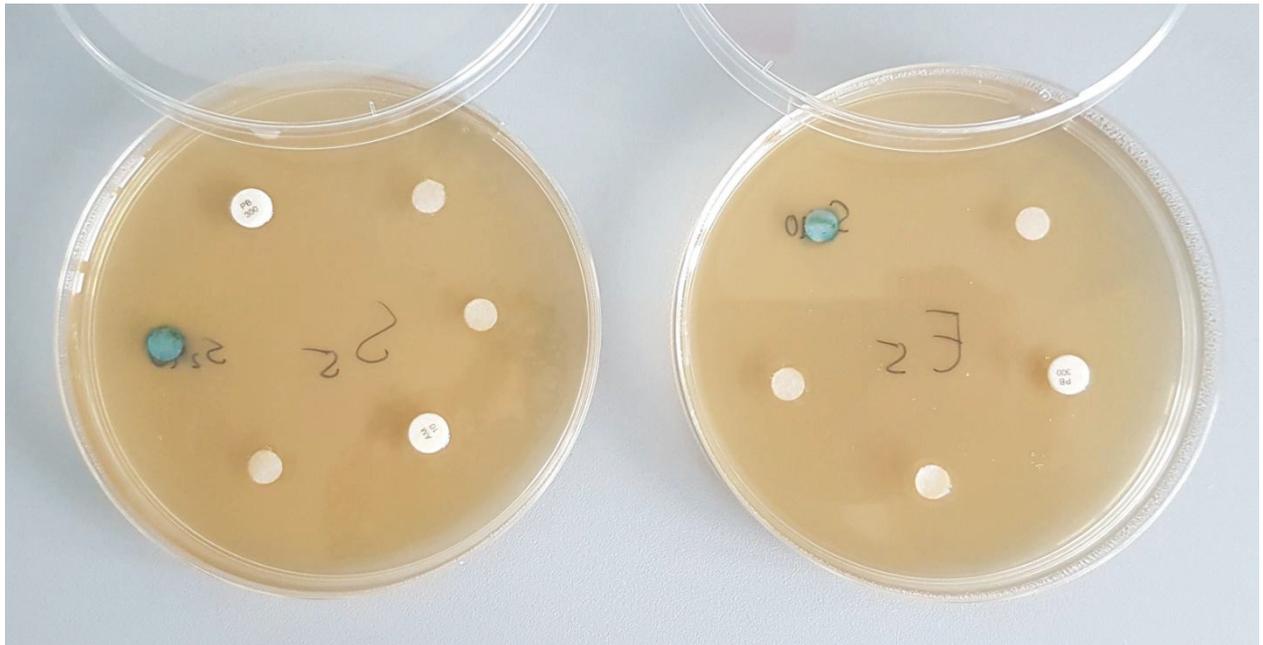


Abbildung 19: Plattenbelegung zweiter Versuch S2 und E2 vor Inkubation

An Platte E2 rechts erkennt man dieselbe Belegung wie im ersten Versuch. Bei der Platte S2 links mit *Staph. epidermidis* sieht man gut die in Abbildung 18 dargestellte Belegung. Außerdem ist auf diesem Bild nochmal der Farbunterschied der einzelnen Extrakte zwischen den verschiedenen Temperaturen sichtbar. Die stark blau gefärbten Plättchen zeigen das 40 °C *Chlorella*- Extrakt.



Abbildung 20: Platte E3 Versuch 2 nach Inkubation

Nach der Inkubationszeit zeigten die *E. coli*- Platten wieder das gleiche Ergebnis wie im ersten Versuch. In Abbildung 20 ist auf Platte E3 wieder die Fremdverkeimung in Form der weißen Punkte zu erkennen. Außerdem sieht man auch hier wieder sehr gut den entstandenen Hemmhof um das Polymyxin B. Auch in diesem Versuch zeigten die Extrakte keine antibakterielle Wirkung.



Abbildung 21: Platte S6 Versuch 2 nach Inkubation

Platte S6 mit den *Spirulina*- Extrakten von Replikat drei in Abbildung 21 zeigte ein völlig anderes Bild. Auch hier war noch schwach ein Hemmhof um das Polymyxin B links oben zu erkennen, jedoch ist dieser überwachsen. Auch hier könnte es sich um eine Fremdverkeimung handeln. Um das Ampicillin hat sich ebenfalls ein jedoch sehr schwer erkennbarer und ebenfalls überwachsener Hemmhof gebildet. Von den Extrakten zeigte wieder keines eine hemmende Wirkung in Form eines Hofes. Die *Staph. epidermidis*- Platten mit den *Chlorella*- Extrakten zeigten die gleichen Ergebnisse wie bei *Spirulina*. In Abbildung 22 ist Platte S3 zu sehen, welche die *Chlorella*- Extrakte des dritten Replikates enthielt.



Abbildung 22: Platte S3 Versuch 2 nach Inkubation

Auch bei diesen Extrakten ist keine hemmende Wirkung ersichtlich. Anhand des zwar undeutlichen Hemmhofes um das Polymyxin B lässt sich jedoch sagen, dass der Test selbst funktioniert hat.

5 Diskussion

Abschließend lässt sich sagen, dass zwar einige Probleme aufgetreten sind, die Untersuchung auf eine antibakterielle Wirkung der Mikroalgenextrakte jedoch funktioniert hat und zu einem Ergebnis geführt hat. Die starke Klumpenbildung bei der Herstellung der *Spirulina*-Suspensionen führte unweigerlich zu Ungenauigkeiten, was nochmal dadurch verstärkt wurde, dass durch häufiges Umfüllen - von den Flaschen in die Kolben, dann in Zentrifugenröhrchen und zum Schluss wieder in Flaschen- der Proben und das Benutzen von Pipetten und Trichtern, jedes Mal Verluste auftraten. Auch die starke Schaumbildung bei dieser Alge erschwerte das genaue Arbeiten. Es lässt sich demnach daraus schließen, dass bei weiteren Studien dieser Art versucht werden muss, die Verluste zu minimieren, zum Beispiel indem man anstelle von drei Replikaten in den Flaschen die entsprechende Menge direkt in den Kolben einwiegt, sodass sich trotzdem die 7 % -ige Konzentration ergibt. Da diese Probleme jedoch nur bei *Spirulina* auftraten, wäre es auch möglich, bei weiterführenden Versuchen oder Wiederholungen neues Rohmaterial zu verwenden, also anderes *Spirulina*- Pulver, zum Beispiel eines anderen Herstellers. Im Rahmen dieser Arbeit war eine erneute Extrakterstellung aus Zeitgründen nicht möglich.

Um die Eigenschaften der hergestellten Extrakte zu untersuchen, waren die Bestimmung des pH-Wertes und der Trockensubstanz geeignet. Beide Messmethoden haben gut funktioniert und plausible Werte für die Extrakte ergeben. Zu dem pH- Wert lässt sich sagen, dass alle Algenextrakte mit Werten von circa 6,5 für *Spirulina* und 7,2 für *Chlorella* im neutralen Bereich lagen. Da als Extraktionsmittel Wasser verwendet wurde, mit welchem die Suspensionen hergestellt wurden, war ein neutraler pH- Wert auch zu erwarten. Die leichten Unterschiede zwischen beiden Mikroalgen müssen auf die unterschiedliche Zusammensetzung der Algenpulver zurückzuführen sein, sodass der etwas saurere pH- Wert von *Spirulina* mit deren Inhaltsstoffen zusammenhängt, zum Beispiel mit einem möglicherweise höheren Anteil an Säuren wie Phenolsäure.

Die Werte der Trockensubstanzbestimmung lagen ebenfalls im erwarteten niedrigen Bereich zwischen 1 und 3 %. Die Trockenmasse von *Spirulina* lag mit 3 % höher als *Chlorella* mit circa 1 %. Dies ist darauf zurückzuführen, dass sich das *Spirulina*- Pulver wesentlich schlechter lösen ließ. Durch die Klumpenbildung und die wesentlich schlechtere Abtrennung nach dem Zentrifugieren blieb hier mehr an Trockenmasse im Extrakt zurück. Die Schwankungen innerhalb dieser Alge zwischen den verschiedenen Temperaturen lagen an den Problemen bei der Suspensionsherstellung. Durch die bereits erwähnte schlechtere Löslichkeit kam es zu

Ungenauigkeiten bei den Konzentrationen der entstehenden Extrakte. Die hohen Werte bei den 40 °C Replikaten entstanden durch die schlechte Abtrennung nach der Zentrifugation, da beim Abgießen der Überstände auch ein Feststoffanteil mit herübergetragen wurde. Es stellt sich die Frage, warum die Trockensubstanz dann bei 70 °C sank und bei 99 °C wieder stieg, zumal die 70 °C Extrakte aus allen drei einzeln hergestellten Replikaten entstanden und nicht aus einer einzigen Charge. Eine mögliche Lösung ist, dass die Trennung nach 70 °C wesentlich besser durchzuführen war als bei den Extrakten der 40 °C Behandlung. Der Grund, dass die Trockensubstanz dann bei den 99 °C Extrakten wieder höher war, könnte darin liegen, dass die Kolben für die 99 °C Behandlung als letztes gefüllt wurden, also mit dem kompletten Rest, welcher in den drei Flaschen der drei Replikate zurückblieb. In diesem letzten Rest waren mehr Klumpen und unlösliche Bestandteile als in den Kolben, welche vorher für die 40 °C und 70 °C Behandlung befüllt wurden. Diese These wird dadurch bestärkt, dass diese Schwankungen bei den *Chlorella*- Extrakten nicht auftraten. Hier zeigte sich eine leicht steigende Trockensubstanz von circa 1,1 % auf 1,5 % mit steigender Temperatur, was auch zu erwarten war, da durch die höhere Temperatur ein besserer Aufschluss der Inhaltsstoffe möglich war, welche ihre Substanzen dadurch freigaben und die Trockenmasse erhöhten.

Die Bestimmung des Gesamtgehaltes an Polyphenolen gestaltete sich schwierig. Die Durchführung war sehr zeitaufwendig, da jede Messung eine Stunde Wartezeit beinhaltete und nicht mehr als sechs bis sieben Proben auf einmal gemessen werden konnten. Die verwendete Folin- Ciocalteu- Methode wurde an der Hochschule Neubrandenburg bisher nur für andere Rohstoffe angewendet, zum Beispiel Schokolade. Dazu kommt, dass die Anleitung auf eine feste Probe ausgerichtet war, nicht auf Extrakte. Da in der Studie von Almendinger et al. in der Durchführung auch die Behandlung von Algenextrakten genannt wird, wurde sich in dieser Arbeit auf diese Anleitung bezogen, jedoch ist dort nicht aufgeführt, wie die Kalibriergerade erstellt wurde.

Aus diesem Grund wurden mehrere Kalibriergeraden erstellt, um die Methode zu erlernen und ein möglichst exaktes lineares Bestimmtheitsmaß zu erhalten. Die Proben wurden, wie in der Anleitung, 1/2 verdünnt verwendet, was auch zu Ergebnissen führte, welche im Bereich der Kalibrierung lagen. Da die Ergebnisse jedoch nicht plausibel waren, muss davon ausgegangen werden, dass die Durchführung und Berechnung so nicht geeignet war. Die Ergebnisse von Almendinger et al. lagen in deren Studie bei den Extrakten verschiedenster Mikroalgenstämme bei einem Gesamtpolyphenolgehalt zwischen 11 und 24 mg Gallussäure- Equivalente pro g Algentrockenmasse. (Almendinger et al., 2021)

Um die Methode an die verwendeten Algenextrakte anzupassen, wurde in dem zweiten Ansatz

eine andere Kalibriergerade erstellt, sowie die Proben ausschließlich in der Vorverdünnung verwendet, ohne diese noch auf die 8,5 ml, wie beim ersten Ansatz, zu verdünnen. Denn diese sehr hohe Verdünnung und die daraus resultierenden, auf der Kalibriergeraden weit unten liegenden Messwerte, könnten eine der Ursachen für die unplausiblen Ergebnisse gewesen sein. Die Ergebnisse aus dieser angepassten Methode lagen mit den Werten von circa 5-14 mg/ g für *Chlorella* und 8-11 mg/ g für *Spirulina* recht nahe an den Werten von Almendinger et al. In einer Studie von Machu et al. wurden mittels verschiedener Extraktionsverfahren Werte von 18 mg/ g für eine andere Gattung von *Chlorella* (*Chlorella pyrenoidosa*) und zwischen 20 und 43 mg/ g für *Spirulina* nachgewiesen, wobei die Einheiten sich auch hier auf Gallussäureequivalente bezogen. Die erreichten Werte im zweiten Ansatz lagen zwar etwas darunter, jedoch könnte hierfür die Extraktionsmethode eine Rolle gespielt haben. Machu et al. fanden heraus, dass destilliertes Wasser als Extraktionsmittel sehr gut geeignet ist. Jedoch wurde hier nur für 10 min bei 80 °C extrahiert, während in dieser Arbeit je 1 h bei den drei Temperaturen extrahiert wurde. (Machu et al., 2015) Sowohl Temperaturen über 70 °C, als auch lange Extraktionszeiten können zum Abbau oder zur Oxidation der Polyphenole führen, wodurch die Ausbeute sinkt. (Mojzer et al., 2016)

Wie in der Studie von Machu et al. lagen die Polyphenolwerte in dieser Arbeit bei *Spirulina* durchschnittlich höher als bei *Chlorella*. Auch im ersten Versuch kam es trotz extremer Werte zu diesem Ergebnis, was darauf schließen lässt, dass diese Mikroalge einen höheren Gehalt an antioxidativen polyphenolischen Verbindungen aufweist. Die starken Schwankungen der Werte, insbesondere bei den 70 °C *Spirulina*- Extrakten, könnten, wie die teilweise hohen Standardabweichungen nahelegen, auf Pipettier- oder Messfehler zurückzuführen sein. Generell muss man dazusagen, dass die Folin- Ciocalteu- Methode nicht sehr spezifisch anzuwenden ist, da das FCR nicht nur von polyphenolischen, sondern auch von anderen Verbindungen reduziert werden kann, was zur Verfälschung der Ergebnisse nach oben hin führt. (Rumpf, 2018) Hinzu kommt, dass die Mikroalgenextrakte, besonders die der niedrigeren Temperaturen, von sich aus eine blaue Färbung besaßen. Da bei dieser Methode ein blauer Farbkomplex nachgewiesen wird, könnte diese Eigenfärbung die Ergebnisse verfälscht haben. Diese mögliche Fehlerquelle trat besonders bei *Spirulina* auf, da diese, wie bereits in Punkt 4.1 erwähnt, eine sehr starke Blau- Färbung aufwies, speziell nach der 40 °C Behandlung. Trotzdem lag dieser Wert unter dem der 70 °C Probe. Dies könnte an Messfehlern, zum Beispiel durch Schwebeteilchen in den Proben, welche die Extinktion störten, liegen. Da in diesem zweiten Ansatz nur eine 70 °C- Probe der *Spirulina*- Extrakte und nicht alle drei Replikate untersucht wurden, könnte das die Erklärung dafür sein, dass die Werte so hoch liegen.

Um diese Werte und die möglichen Ursachen näher zu untersuchen, müsste man in möglichen weiteren Schritten nochmal alle Extrakte messen und vergleichen. Da die Extrakte jedoch schon recht alt sind, sollten dafür neue produziert werden. Es könnte eine weiterführende Arbeit darin bestehen, diese Methode für Algenextrakte noch weiter zu optimieren und mögliche Fehlerquellen auszuschließen. Auch könnte man verschiedene Extraktionsverfahren anwenden, sowie nach Möglichkeiten suchen, Störfaktoren wie andere antioxidativ wirkende Verbindungen zu entfernen.

Die Versuche, eine mögliche antibakterielle Wirkung der Mikroalgenextrakte nachzuweisen, führten zu einem negativen Ergebnis. Zunächst muss gesagt werden, dass es auf den Platten zu einer Fremdverkeimung kam. Da sowohl der verwendete Caso- Agar, als auch der Weichagar und die Nährmedien für die Bakterienkulturen vor der Verwendung autoklaviert wurden, können diese als Quelle ausgeschlossen werden. Das gleiche gilt für die Kolben und Glasflaschen, in denen sich diese befanden, da diese mit autoklaviert wurden. Auch die verwendeten Petrischalen können als Ursache ausgeschlossen werden, da diese steril verpackt waren und für die Versuche eine neue verschlossene Packung verwendet wurde. Eine Ursache für eine Verkeimung könnten die Algenextrakte selbst sein, da diese über circa 14 Tage kühl gelagert wurden und nicht tiefgefroren waren. Da die Algen durch ihre hohen Gehälter an Proteinen und Zuckern ebenfalls ein Nährmedium darstellen könnten und einige der Extrakte nur bei 40 °C und 70 °C behandelt wurden, könnten sich Keime wie Schimmelpilze in ihnen vermehrt haben. Aus diesem Grund sollte bei anderen Versuchen dieser Art der mikrobiologische Test entweder zuerst durchgeführt werden, oder aber die Extrakte werden zwischen den Versuchen eingefroren. Sollten die Extrakte die Ursache für die Verkeimung sein, wäre diese jedoch sehr wahrscheinlich um die Extraktplättchen auf den Platten herum konzentrierter und nicht über die ganze Platte verteilt, wie es bei den *E. coli*- Platten der Fall war. Aus diesem Grund muss die Ursache in der Bakterienkultur selbst liegen. Diese wurde am 14.06.21 auf einer Platte ausgestrichen und inkubiert. Da die Verkeimung in Form der kleinen weißen Punkte nur bei den *E. coli*- Platten in diesem Ausmaß auftraten, könnte der Fremdorganismus aus dieser Kultur stammen. Jedoch war auch auf den *Staph. epidermidis*- Platten etwas zu erkennen, was auf eine Fremdverkeimung hindeutet, da die Hemmhöfe um die Antibiotika zwar zu sehen, teilweise aber überdeckt waren und nicht komplett klar, wie es sein sollte. Dafür spricht auch die Tatsache, dass um das Ampicillin im zweiten Versuch auf den *Staph. epidermidis*- Platten der Hemmhof sehr schwach war. Möglicherweise wurde die Hemmung durch das Antibiotikum durch die Fremdverkeimung beeinflusst.

Generell lässt sich sagen, dass die Versuche trotz der Fremdverkeimung gut funktioniert haben,

da besonders bei den *E. coli*- Platten die Hemmhöfe um das Polymyxin B sehr gut zu erkennen waren. Ebenso erkannte man, dass um die Extrakte, egal bei welcher Temperatur diese hergestellt wurden, kein Hemmhof vorhanden war. Auch um die Negativkontrolle zeigte sich, wie zu erwarten, kein Hemmhof. Dies und die Tatsache, dass um das Antibiotikum bei den *E. coli*- Platten jedes Mal ein Hemmhof auftrat, spricht für das Funktionieren der Versuche. Auch bei den *Staph. epidermidis*- Platten traten Hemmhöfe um das Antibiotikum auf, wenn auch nicht so deutlich wie bei *E. coli*. Bei einigen Platten war auch ein Unterschied um die Extrakt-Plättchen herum zu erkennen, da dies jedoch ebenfalls bei der Negativkontrolle der Fall war, spricht dies nicht für eine hemmende Wirkung, zumal der Unterschied zu dem Hemmhof um das Antibiotikum deutlich zu sehen war.

Es lässt sich also abschließend sagen, dass die hergestellten Mikroalgenextrakte als solche, keine hemmende Wirkung auf die beiden verwendeten Bakterienkulturen zu haben scheinen. Dies schließt jedoch nicht aus, dass die Algen Inhaltsstoffe besitzen, welche eine solche Wirkung haben könnten. Es darf nicht vergessen werden, dass die Extrakte durch den Gehalt an Nährstoffen auch als Energiequelle für die Mikroorganismen genutzt werden können, statt deren Wachstum zu hemmen.

Nichtsdestotrotz wurden in Studien bereits zahlreiche Verbindungen in Algen und Mikroalgen entdeckt, welche eine antibakterielle Aktivität aufwiesen. Der Grund dafür, dass die Mikroalgenextrakte in dieser Arbeit keine hemmende Wirkung auf die beiden Bakterienkulturen zeigten, könnte deshalb in der Zusammensetzung der Extrakte begründet sein. Der Anteil der antibakteriell aktiven Substanzen war wahrscheinlich zu gering. Außerdem könnten die übrigen Bestandteile die Wirkung beeinflusst haben. Des Weiteren wird in der Publikation von Shannon und Abu- Ghannam berichtet, dass der Einfluss des Extraktionsmittels einen erheblichen Einfluss auf die antibakterielle Wirkung haben kann. Die Polarität des Lösungsmittels beeinflusst die Wechselwirkung der Extrakte mit funktionellen Gruppen auf der Oberfläche der Bakterien. (Shannon; Abu- Ghannam, 2016)

Eine Möglichkeit der weiterführenden Versuche wäre demnach, die Extraktion mit anderen Extraktionsmitteln, wie Methanol oder Aceton, zu versuchen. Da die Algenextrakte als Ganzes in diesem Versuch keine hemmende Wirkung aufwiesen, könnte man außerdem versuchen, einzelne Substanzen aus den Algenpulvern zu extrahieren und die Hemmhoftests zu wiederholen.

Trotz der vielen Verbindungen, die in Mikroalgen für eine antibakterielle Wirkung sorgen können, ist die Entwicklung als alternative Antibiotika schwierig, aufgrund der geringen Menge

der extrahierten Verbindungen, sowie der aufwendigen chemischen Synthese dieser Substanzen. Die Erforschung bestimmter Mikroalgen- Verbindungen wird mit zunehmender Technologie Fortschritte machen. Rojas et al. versprechen sich in ihrer Publikation zum Beispiel vieles von den Omics- Technologien, besonders der Proteomik, da diese dabei helfen soll, die bakterizide Aktivität von Mikroalgenpeptiden zu verstehen und nutzbar zu machen. (Rojas et al., 2020)

Doch da die Mikroalgen eine so vielversprechende Quelle, nicht nur als alternative Antibiotika, sondern auch in der Lebensmittelindustrie sind, wird die Forschung auf diesem Gebiet nicht abnehmen, sodass weitere Versuche auf diesem Gebiet in jedem Fall sinnvoll sind und einen hohen Nutzen aufweisen können.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollten Extrakte aus Mikroalgen- Pulvern zweier Algenstämme, *Chlorella vulgaris* und *Arthrospira platensis* hergestellt, charakterisiert und auf ihre antibakterielle Wirkung untersucht werden. Die Extrakte wurden mittels Heißwasser- Extraktion gewonnen, wobei die Wärmebehandlung bei drei verschiedenen Temperaturen (40, 70, 99 °C) durchgeführt wurde, um einen eventuellen Einfluss der Temperatur auf die Eigenschaften der Extrakte, aufzuzeigen. Die schlechte Löslichkeit des *Spirulina*- Pulvers führte jedoch zu Ungenauigkeiten, welche sich auch in den folgenden Ergebnissen der Versuche widerspiegelte.

Für die Charakterisierung der Extrakte wurden der pH- Wert, die Trockensubstanz und der Gesamtgehalt an Polyphenolen ermittelt. Der pH- Wert der Extrakte lag bei beiden Mikroalgen im neutralen Bereich, wobei *Spirulina* mit 6,5 etwas saurer als *Chlorella* mit 7,2 war. Die Trockensubstanz lag mit 1-3 % im erwarteten niedrigen Bereich, wobei die schlechtere Löslichkeit und Abtrennung nach dem Zentrifugieren bei den *Spirulina*- Extrakten zu der etwas höheren Trockensubstanz von 3 % führte, während die *Chlorella*- Extrakte mit etwa 1 % weniger Trockenmasse enthielten. Bei den *Chlorella*- Extrakten zeigte sich eine Temperaturabhängigkeit bei beiden Messungen, sowohl der pH- Wert, als auch die Trockenmasse, stiegen mit steigender Temperatur leicht an. Während der pH- Wert der *Spirulina*- Extrakte gleich blieb, kam es bei der Trockensubstanzmessung zu starken Schwankungen aufgrund der Ungenauigkeiten beim Herstellen der betreffenden Extrakte.

Die Bestimmung des Polyphenolgehaltes mittels kolorimetrischer Methode ergab, dass *Spirulina* generell einen höheren Gehalt dieser antioxidativen Verbindungen als *Chlorella* aufweist. Es wurden Werte zwischen 5 und 14 mg/ g ermittelt, wobei es bei den Messungen teilweise zu starken Abweichungen vom arithmetischen Mittel kam. Die Untersuchung auf eine antibakterielle Wirkung wurde mittels Hemmhofstest oder Diffusionstest durchgeführt, wobei bei beiden Mikroalgen keine Hemmung auf die zwei verwendeten Bakterienstämme *Escherichia coli* und *Staphylococcus epidermidis* festgestellt werden konnte. Mittels Positivkontrolle in Form des Antibiotikums Polymyxin B wurde sichergestellt, dass das Testverfahren richtig funktioniert, was auch durch Hemmhöfe um diese Substanz bestätigt wurde. Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass die hergestellten Mikroalgenextrakte in ihrer Gesamtheit auf die beiden verwendeten Bakterienkulturen keine hemmende Wirkung besitzen, jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass einzelne Verbindungen in den Extrakten eine solche Wirkung haben könnten. Es sollte demnach weiter an dieser Thematik geforscht werden.

7 Literaturverzeichnis

Almendinger, M.; Saalfrank, F.; Rohn, S.; Kurth, E.; Springer, M.; Pleissner, D.: Characterization of selected microalgae and cyanobacteria as sources of compounds with antioxidant capacity. *Algal Research*. Volume 53. 2021. 102168. ISSN 2211-9264. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102168>.

Camacho, F.; Macedo, A.; Malcata, F.: Potential Industrial Applications and Commercialization of Microalgae in the Functional Food and Feed Industries: A Short Review. *Mar Drugs*. 2019. doi: 10.3390/md17060312. PMID: 31141887; PMCID: PMC6628611.

El-Naggar, N.E.; Hussein, M.H.; Shaaban-Dessuuki, S.A.; Dalal, S.R.: Production, extraction and characterization of *Chlorella vulgaris* soluble polysaccharides and their applications in AgNPs biosynthesis and biostimulation of plant growth. *Sci Rep*. 2020. doi: 10.1038/s41598-020-59945-w. PMID: 32080302; PMCID: PMC7033187.

Hensel, B.; Jakop, U.; Scheinpflug, K.; Schröter, F.; Sandmann, M.; Mühldorfer, K.; Schulze, M.: Low temperature preservation: Influence of putative bioactive microalgae and hop extracts on sperm quality and bacterial load in porcine semen. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. Volume 19. 2021. 100359. ISSN 2352-5541. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100359>.

Khan, M.I.; Shin, J.H.; Kim, J.D.: The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microb Cell Fact*. 2018. doi: 10.1186/s12934-018-0879-x. PMID: 29506528; PMCID: PMC5836383.

Machu, L.; Misurcova, L.; Vavra Ambrozova, J.; Orsavova, J.; Mlcek, J.; Sochor, J.; Jurikova, T.: Phenolic content and antioxidant capacity in algal food products. *Molecules*. 2015. <https://doi.org/10.3390/molecules20011118>.

Martelli, F.; Alinovi, M.; Bernini, V.; Gatti, M.; Bancalari, E.: *Arthrospira platensis* as Natural Fermentation Booster for Milk and Soy Fermented Beverages. *Foods*. 2020. doi: 10.3390/foods9030350. PMID: 32197327; PMCID: PMC7142653.

Mojzer, E.B.; Hrnčič, M.K.; Škerget, M.; Knez, Ž.; Bren, U.: Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules*. 2016. doi: 10.3390/molecules21070901. PMID: 27409600; PMCID: PMC6273793.

Rojas, V.; Rivas, L.; Cárdenas, C.; Guzmán, F.: Cyanobacteria and Eukaryotic Microalgae as Emerging Sources of Antibacterial Peptides. *Molecules*. 2020. doi: 10.3390/molecules25245804. PMID: 33316949; PMCID: PMC7763478.

Rumpf, J.: Entwicklung und Optimierung einer Methode zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität von Kraft- und Organosolv-Lignin via FolinCiocalteu-Assay. Hochschule Bonn-Rhein-Sieg Fachbereich Angewandte Naturwissenschaften. 2018. Verfügbar unter: https://pub.h-brs.de/frontdoor/deliver/index/docId/4633/file/JessicaRumpf_Masterarbeit_2018.pdf [Zugriff am: 07.07.2021]

Shannon, E.; Abu-Ghannam, N.: Antibacterial Derivatives of Marine Algae: An Overview of Pharmacological Mechanisms and Applications. *Mar Drugs*. 2016. doi: 10.3390/md14040081. PMID: 27110798; PMCID: PMC4849085.

Spolaore, P.; Joannis-Cassan, C.; Duran, E.; Isambert, A.: Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng*. 2006. doi: 10.1263/jbb.101.87. PMID: 16569602.

8 Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Materialien	11
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien	12
Tabelle 3: Pipettierschema Gallussäure- Kalibrierreihe.....	15
Tabelle 4: Kalibrierwerte	16
Tabelle 5: pH- Werte.....	21
Tabelle 6: Trockensubstanz- Werte.....	22
Tabelle 7: Extinktionen der Extrakte	25
Tabelle 8: Gesamtgehalt an Polyphenolen in mg/ l.....	26
Tabelle 9: Pipettierschema Gallussäure- Kalibrierreihe Ansatz 2	28
Tabelle 10: Kalibrierwerte Ansatz 2	28
Tabelle 11: Polyphenolgehalt Ansatz 2.....	30
Tabelle 12: Plattenbenennung	34
Tabelle 13: Polyphenolwerte Ansatz 1.....	54
Tabelle 14: Polyphenolwerte aller Verdünnungen Ansatz 2.....	55

Abbildung 1: Übersicht der einzelnen Extrakte	13
Abbildung 2: Kalibrierfunktion Gallussäure.....	16
Abbildung 3: Vergleich Rückstand beider Algen	19
Abbildung 4: Farbvergleich Spirulina bei drei Temperaturen	20
Abbildung 5: Trockensubstanz Chlorella.....	23
Abbildung 6: Trockensubstanz Spirulina.....	23
Abbildung 7: Kalibriergerade Gallussäure Ansatz 2.....	29
Abbildung 8: Polyphenolgehalt Chlorella.....	31
Abbildung 9: Polyphenolgehalt Spirulina	32
Abbildung 10: Plattenbelegung.....	33
Abbildung 11: Platte E2 vor Inkubation	34
Abbildung 12: Platte E2 nach Inkubation	35
Abbildung 13: Platte E2 gegen das Licht fotografiert.....	36
Abbildung 14: Platte E5 nach Inkubation	37
Abbildung 15: Platte S3 nach Inkubation	38
Abbildung 16: Platte S2 nach Inkubation	39
Abbildung 17: Platte S4 nach Inkubation	39
Abbildung 18: Plattenbelegung mit Ampicillin	40
Abbildung 19: Plattenbelegung zweiter Versuch S2 und E2 vor Inkubation	41
Abbildung 20: Platte E3 Versuch 2 nach Inkubation.....	42
Abbildung 21: Platte S6 Versuch 2 nach Inkubation	42
Abbildung 22: Platte S3 Versuch 2 nach Inkubation	43

9 Verzeichnis der Anlagen

Anlage 1	Ergebnisse Polyphenolbestimmung Ansatz 1
Anlage 2	Ergebnisse Polyphenolbestimmung aller Verdünnungen Ansatz 2

Anlage 1

Tabelle 13: Polyphenolwerte Ansatz 1

Probe	1. Messung	2. Messung	Durchschnitt	Standard- abweichung	VF 1	VF 2	c in mg/l	TS in g/l	Gehalt in mg/g
C1 40	0,153	0,146	0,150	0,004	2	85	16686,563	10,87	1535,102
C2 40	0,148	0,146	0,147	0,001	2	85	16553,750	11,43	1448,272
C3 40	0,147	0,146	0,147	0,001	2	85	16527,188	11,67	1416,211
S1 40	0,299	0,301	0,300	0,001	2	85	24681,875	30,93	797,991
S2 40	0,338	0,328	0,333	0,005	2	85	26435,000	38,83	680,788
S3 40	0,301	0,293	0,297	0,004	2	85	24522,500	34,43	712,242
C1 70	0,141	0,143	0,142	0,001	2	85	16288,125	12,97	1255,831
C2 70	0,141	0,144	0,143	0,002	2	85	16314,688	13,27	1229,441
C3 70	0,145	0,146	0,146	0,001	2	85	16474,063	14,23	1157,699
S1 70	0,155	0,163	0,159	0,004	4	85	34382,500	23,2	1482,004
S2 70	0,157	0,157	0,157	0,000	4	85	34170,000	25,1	1361,355
S3 70	0,159	0,151	0,155	0,004	4	85	33957,500	22,23	1527,553
C1 99	0,148	0,151	0,150	0,002	2	85	16686,563	14,73	1132,828
C2 99	0,146	0,147	0,147	0,001	2	85	16527,188	14,9	1109,207
C3 99	0,147	0,15	0,149	0,002	2	85	16633,438	14,67	1133,840
S1 99	0,257	0,258	0,258	0,001	2	85	22424,063	34,77	644,926
S2 99	0,247	0,254	0,251	0,004	2	85	22052,188	31,9	691,291
S3 99	0,244	0,248	0,246	0,002	2	85	21813,125	30,73	709,832

Anlage 2

Tabelle 14: Polyphenolwerte aller Verdünnungen Ansatz 2

Probe	VF	Messung 1	Messung 2	Durchschnitt	Standard- abweichung	c in mg/l	TS in g/l	Gehalt in mg/g
C2 40	10	0,148	0,152	0,150	0,002	80,345	11,430	7,029
C2 40	5	0,34	0,357	0,349	0,008	211,293	11,430	18,486
C2 40	2	0,684	0,456	0,570	0,114	160,897	11,430	14,077
C2 70	10	0,15	0,151	0,151	0,001	81,207	13,270	6,120
C2 70	5	0,208	0,202	0,205	0,003	87,586	13,270	6,600
C2 70	2	0,35	0,342	0,346	0,004	83,655	13,270	6,304
C3 99	10	0,149	0,148	0,149	0,001	77,759	14,670	5,301
C3 99	5	0,211	0,2	0,206	0,005	88,017	14,670	6,000
C3 99	2	0,342	0,353	0,348	0,005	84,172	14,670	5,738
S1 40	10	0,414	0,283	0,349	0,066	422,586	30,930	13,663
S1 40	5	0,433	0,374	0,404	0,030	258,707	30,930	8,364
S1 40	2	1,002	0,74	0,871	0,131	264,690	30,930	8,558
S2 70	10	0,348	0,436	0,392	0,044	497,586	25,100	19,824
S2 70	5	0,62	0,619	0,620	0,001	444,914	25,100	17,726
S2 70	2	0,791	1,076	0,934	0,143	286,241	25,100	11,404
S2 99	10	0,268	0,279	0,274	0,006	293,276	31,900	9,194
S2 99	5	0,45	0,404	0,427	0,023	278,966	31,900	8,745
S2 99	2	0,798	0,84	0,819	0,021	246,759	31,900	7,735

Erklärung über die selbstständige Anfertigung der Arbeit

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt worden ist und ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Textstellen, die wörtlich oder annähernd wörtlich aus Veröffentlichungen entnommen wurden, sind durch Zitate als solche gekennzeichnet.

Ich erkläre weiterhin, dass die abgegebene digitale Version mit der eingereichten schriftlichen Arbeit übereinstimmt.

Neubrandenburg, 02.08.2021

Lena Schnittke