

Abschlussbericht zum Max-Buchner-Forschungsprojekt

Wirksamkeit von photokatalytischen Oberflächen gegen Algenbewuchs auf Fassaden

(Kennziffer 2786)

Dipl.-Biol. Franziska Gladis, PD Dr. Rhena Schumann
Universität Rostock, Institut für Biowissenschaften, Angewandte Ökologie, Albert-Einstein-Str. 3, 18051 Rostock

Einleitung

Mikroorganismen sind in der Lage, nahezu alle Oberflächen zu besiedeln. Auf Häuserfassaden kann ein Bewuchs, neben der ästhetischen Beeinträchtigung durch Verfärbungen, auch die Bausubstanz schädigen (Scheerer et al. 2009). Vielfach wurde beobachtet, dass Grünalgen als Erstbesiedler die Grundlage für weiteren Bewuchs auf Fassaden bilden.

Eine Innovation im Bereich der Bewuchsbekämpfung sind photokatalytisch wirksame Oberflächen, deren Umweltgefährdung deutlich positiver als die von Bioziden zu bewerten ist. Photokatalyse ist die Bildung freier Radikale unter Licht bzw. UV-Strahlung, welche die Zellen durch oxidative Reaktionen schädigen. Ein besonderer Umweltaspekt ist die Katalysatoreigenschaft der Partikel als sich nicht verbrauchender Wirkstoff, da die Radikale aus Wasser und somit immer wieder neu gebildet werden können. Eine längere Wirksamkeit wird so ermöglicht. Das mikrobizide Potential gegenüber Mikroalgen, das aufgrund des Wirkprinzips der Photokatalyse zu erwarten ist, soll in dieser Arbeit experimentell untersucht werden. Dabei wurden verschiedene photokatalytische Materialien untersucht und schließlich ein Verfahren entwickelt, mit dem verschiedene Produkte hinsichtlich ihrer bewuchshemmenden Wirkung miteinander verglichen werden können.

Bedingungen der Wirksamkeitsprüfung

Das Problem der Veralgung von Fassaden und anderen künstlichen Hartsubstraten tritt in der Regel an Nordfassaden, die vor starker Sonneneinstrahlung und schneller Verdunstung von Tau- und Regenwasser gekennzeichnet sind, auf. Die geringe UV-Strahlung im Habitat der Grünalgen wurde auf die Bedingungen im Labor übertragen, um die photokatalytische Wirkung nicht zu überschätzen. So betrug sie für alle Versuche zwischen 3 und 4 W m⁻² UVA-Strahlung und für die Versuche mit Zinkoxid zudem etwa 0,15 W m⁻² UVB-Strahlung. Das Wachstum der Grünalgenisolate aus der Stammsammlung der Universität Rostock wurde durch photosynthetisch aktive Strahlung (PAR) von 40 – 45 µmol Photonen m⁻² s⁻¹ angeregt.

Da Photokatalyse durch UV-Strahlung angeregt wird, ist es von besonderer Bedeutung möglicherweise hemmende Effekte dieser Strahlung zu erkennen. Daher wurden verschiedene Kontrollansätze untersucht: (1) Inkubationen ohne Photokatalysator unter UV-Strahlung (UV-Kontrolle), (2) mit Photokatalysator ohne UV-Strahlung, um mögliche Effekte des Photokatalysators zu erkennen und (3) ohne Photokatalysator und ohne UVA-Strahlung, um möglichen Stress durch die Inkubationsbedingungen, z.B. Trockenstress, zu kontrollieren. Es wurden jeweils drei Replikate analysiert.

Die auf Oberflächen wachsenden Algen wurden bei 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert und regelmäßig durch Medium mit Nährstoffen und Wasser versorgt. Alle Versuche erfolgten bei 21,5 +/- 1,5 °C.

Wirksamkeit von Nanopartikeln aus Zinkoxid

Die photokatalytische Wirksamkeit von Nanopartikeln aus Zinkoxid wurde auf feucht gehaltenen Glasfaserfiltern untersucht. Dabei wurde die Veränderung der Biomasse der Algen über die Zeit PAM-fluorometrisch quantifiziert (Eggert et al. 2006). Abbildung 1 stellt die Wirkung ansteigender Zinkoxidpartikelkonzentrationen unter UV-Strahlung sowie ohne UV-Induktion auf das Wachstum des aeroterrestrischen Grünalgenisolates *Stichococcus* sp.

dar. Unter UV-Strahlung war das Wachstum der Algen bei geringeren Partikelkonzentrationen inhibiert und eine photokatalytische Wirkung auf die Algen wurde somit nachgewiesen.

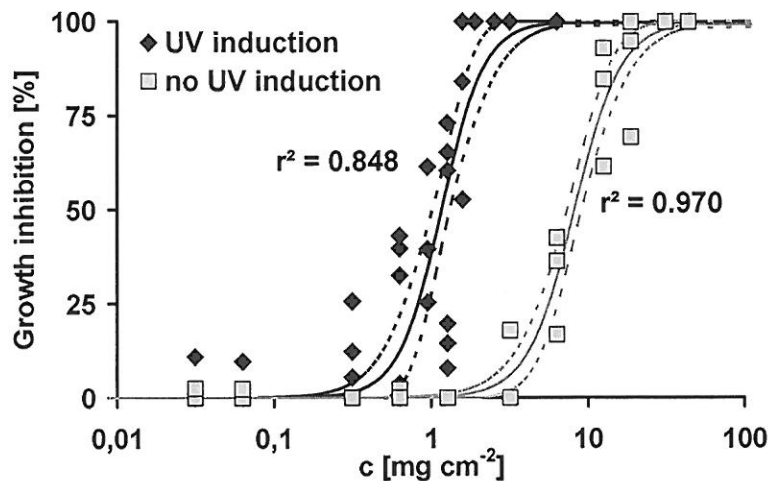


Abb. 1: Dosis-Wirkungskurven mit berechneten (Punkte) und nach Hill-Modell gefitteten (Linie) Wachstumsinhibitionen (%) für Zinkoxid-Nanopartikel (mg cm^{-2}) mit und ohne UV-Strahlung für *Stichococcus* sp.; Mittel-werte \pm SD $n=3$; Modellprüfung in GraphPad-Prism.

Weitere Vitalitätsparameter wurden verwendet, um die photokatalytische Wirkung genauer zu charakterisieren. Die Wirkung der niedrigsten Zinkoxid-Konzentration, welche das Wachstum vollständig hemmte ($\text{EC}_{100} = 1,9 \text{ mg cm}^{-2}$), wurde nach 4tägiger Inkubation unter oben definierten Standardbedingungen untersucht. Der Fluoreszenzfarbstoff Sytox® Green, der nur in Zellen mit permeabilisierten Membranen eindringt, weist tote Zellen, die sich nicht mehr erholen können, nach. Zinkoxid unter UV-Induktion permeabilisierte die Zellmembranen bei 16% der Algenzellen (Abb. 2). Dagegen war der Chlorophyll a-Gehalt im Vergleich zur Kontrolle (unter UV-Strahlung, ohne Zinkoxid) sogar um zwei Drittel reduziert. Die unter Blauanregung mikroskopisch sichtbare rote Chlorophyllfluoreszenz war bei 39% der Algenzellen deutlich abgeschwächt. Die maximale Quantenausbeute, welche mit dem PAM-2000 (Heinz Walz GmbH) gemessen wurde, sank durch die photokatalytische Wirkung um 26%. Mittels einer Optoden-basierten Methode der Sauerstoffmessung (PreSens GmbH) wurden Respiration (Sauerstoffabnahme im Dunkeln) und Nettoproduktion (Sauerstoffzunahme im Licht) gemessen. Die Primärproduktion bzw. Bruttoproduktion der Algen, welche sich aus der Summe von Respiration und Nettoproduktion ergibt, nahm durch die photokatalytische Wirkung um 28% ab. Zinkoxidpartikel unter UV-Strahlung hemmten also verschiedenste Zellfunktionen, von strukturellen Zelleigenschaften bis hin zu Leistungsparametern, wie der Photosynthese. Durch diesen breiten Wirkmechanismus ist eine effektive Wirksamkeit gegenüber dem Algenwachstum auf der Oberfläche zu erwarten.

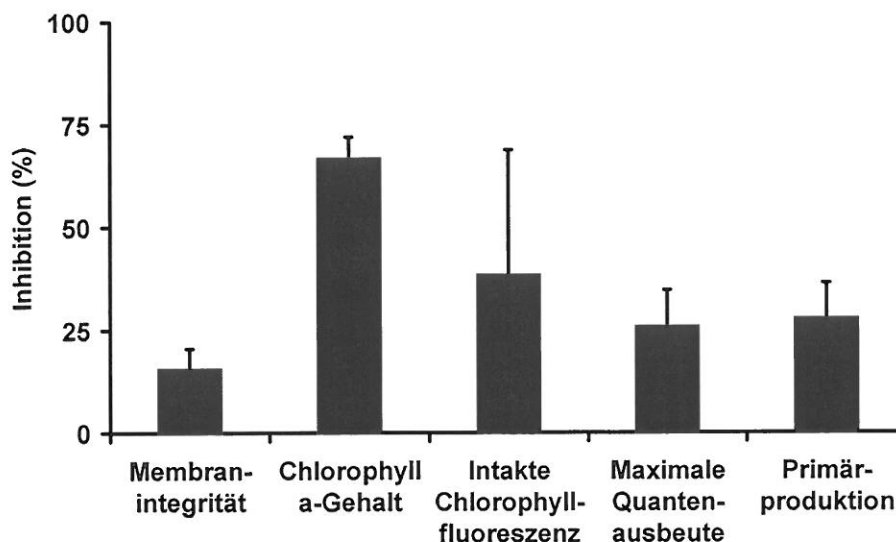


Abb. 2: Inhibition (%) der Vitalität (%) von *Stichococcus* sp. im Vergleich zur Kontrolle gemessen als Membranintegrität, Chlorophyll a-Gehalt, intakter Chlorophyllfluoreszenz, F_v/F_m und Primärproduktion nach 4tägiger Inkubation der EC_{100} von Zinkoxid unter UV (1.9 mg cm^{-2}). Mittelwerte \pm SD, $n=3$.

Wirksamkeit von photokatalytisch beschichteten Oberflächen

Nachdem die Ergebnisse mit Zinkoxid eine Wirksamkeit der Photokatalyse auf die Algenvitalität zeigten, sollte im Folgenden die Wirksamkeit im mutmaßlich geschützteren Biofilm untersucht werden. Dafür wurde ein Verfahren entwickelt, das nun auch standardmäßig zur Prüfung weiterer Produkte verwendet werden kann. Der Unterschied zum oben beschriebenen Verfahren für Zinkoxid war hier die Inkubation auf Oberflächen, die austrocknen können. Dadurch wurde die Ausbildung von Biofilmen gefördert und die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Umwelt verbessert. Die Untersuchung von Biofilmen hat, im Gegensatz zu den Untersuchungen in Suspension, in erster Line andere, für die Algen z.T. schwierigere Randparameter, Gradienten und Schutzsysteme zur Folge. Um den Praxisbezug zu gewährleisten, wurden Materialien verwendet, welche im Handel bereits als photokatalytisch aktive Materialien vertrieben werden. Neben Dachziegelscherben wurden vor allem photokatalytisch beschichtete Glasscherben verwendet.

Zunächst wurde die Quantifizierung der Algenzellzahl auf der Materialoberfläche optimiert. Nachdem fluorometrische Methoden und makroskopische Bildanalyse aufgrund ihrer hohen Nachweisgrenze ausgeschlossen wurden mussten, erfolgte die Quantifizierung mikroskopisch. Da das Auszählen der Zellzahl zu zeitaufwendig für die zahlreichen Proben war, wurden Mikrofotografien aufgenommen, welche im Anschluss an das Experiment bildanalytisch ausgewertet worden sind. In Abständen von drei Tagen wurde die Biomasse der Algen quantifiziert. Aus den ermittelten Biomassen wurden Wachstumsraten der Algen berechnet. Neben dem Wachstum wurde die Zellpermeabilität als Vitalitätsparameter untersucht. Dafür wurden die Scherben am Ende eines jeden Versuches mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYTOX®Green gefärbt und am Epifluoreszenzmikroskop der Anteil gefärbter und damit toter Zellen bestimmt. Die Wirksamkeit der photokatalytischen Materialien wurde an vier aeroterrestrischen Grünalgenarten untersucht, die sich in Wachstumsrate, Zellgröße und Anpassung an ihren extremen Lebensraum unterscheiden und damit die aeroterrestrische Algengemeinschaft repräsentieren. Für die Untersuchung des Algenwachstums auf Oberflächen wurde ein Kompromiss aus naturnahen und wachstumsfördernden Bedingungen gesucht. Dabei wurden verschiedene Inkubationsdesigns auf ihre Eignung überprüft (Tab. 1). Der entscheidende Faktor war die Wasserversorgung der Algen, welche ein positives Wachstum der Kontrollen ermöglichen soll. Während Ansatz B und D das Wachstum der Algen eher inhibierten, führte das tägliche Tauchen (C) zu stark schwankenden Biomassen auf den Scherben. Vermutlich wurden die Zellen durch die Prozedur abgewaschen. Dagegen führte das tägliche Beregnen von flachen Scherben (A) zu stabilen Biofilmen auf den Oberflächen. Zudem zeigten sich artspezifische Unterschiede im Potential der Algen, auf Oberflächen zu wachsen. Als besonders geeignet stellte sich hier das Isolat *Coccomyxa* sp. heraus, welches sowohl tolerant gegenüber UV-Strahlung als auch Wachstum in 100% Luftfeuchte war. Dagegen könnte das gehemmte Wachstum der anderen empfindlicheren Isolate den Nachweis der photokatalytischen Wirkung überdecken und zu falschpositiven Ergebnissen führen.

Tabelle 1. Inkubationsdesigns mit Beschreibung der Flüssigkeitsversorgung, Scherbenpositionierung und Strahlungsbedingungen.

Inkubationsdesign	Flüssigkeitsversorgung	Scherbenpositionierung	Strahlungsintensität
A	Tägliches Beregnen mit verdünntem Medium	Flach	PAR: ~ 45 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ UVA: ~ 4 W m^{-2}
B	Tägliches Beregnen mit verdünntem Medium	45°	PAR: ~ 45 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ UVA: ~ 4 W m^{-2}
C	Tägliches Tauchen in verdünntem Medium für 30 min	45°	PAR: ~ 45 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ UVA: ~ 4 W m^{-2}
D	Tägliches Beregnen mit verdünntem Medium	45°	PAR: ~ 45 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ UVA: ~ 7 W m^{-2}

Im Folgenden sind die Ergebnisse für die Wirksamkeit von photokatalytisch beschichteten Glasscherben auf das Wachstum von *Coccomyxa* sp. für das Inkubationsdesign A dargestellt (Abb. 3). Das Wachstum auf den photokatalytisch beschichteten Glasscherben unter UVA-Strahlung unterschied sich nicht von dem auf den verschiedenen Kontrollansätzen. Auch die UV-Strahlung hemmte das Wachstum nicht. Eine photokatalytische Wirkung auf das Wachstum von *Coccomyxa* sp. wurde somit nicht nachgewiesen.

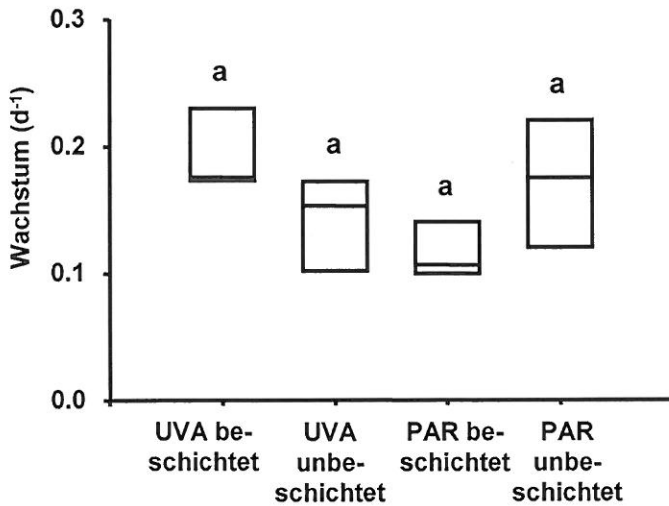


Abb. 3: Wachstum (d^{-1}) von *Coccomyxa* sp. auf photokatalytisch beschichteten Scherben unter UVA und Kontrollen. Dargestellt sind Minimum und Maximum als Boxen sowie Median als Linie ($n=3$). Buchstaben repräsentieren signifikante Unterschiede zwischen den Ansätzen ($p \leq 0,05$).

Der Vitalitätsparameter Wachstum ist ein Summenparameter und überdeckt möglicherweise die Schädigung einzelner Zellen. Aus diesem Grund wurden zusätzlich zellspezifische Parameter angewendet, die den Anteil von betroffenen und unbetroffenen Zellen quantifizieren. Dafür wurden die Algen direkt auf die Materialoberfläche aufgetragen. Um ein Abfließen der Algensuspension zu verhindern, wurden Schablonen auf die Materialscherben geklebt. Die Höhe der Algensuspension betrug maximal 1 mm. Somit war ein Kontakt der Algen, die schnell absedimentierten, mit der Oberfläche gewährleistet. Um eine Erholung bei nachlassender Aktivität der Oberfläche auszuschließen, wurden die Algen bei Dauerlicht inkubiert. Nach 48 Stunden sind die Algen homogenisiert abgenommen und mit verschiedenen Methoden analysiert worden. Zum einen sind die Algen mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYTOX® Green gefärbt worden. Die anschließende epifluoreszenzmikroskopische Analyse weist eine mögliche Permeabilisierung der Zellmembranen und damit eine Abtötung der Algen nach. Der Test auf intrazelluläre Radikale weist Algenzellen mit oxidativem Stress nach, während die Esteraseinhibition als ein sensibler Parameter für die Vitalität von Algen gilt. Es zeigte sich jedoch, dass auch hier die Algenvitalität nicht inhibiert wurde (Abb. 4). Die Algenzellen wurden durch photokatalytisch gebildete Radikale nicht geschädigt.

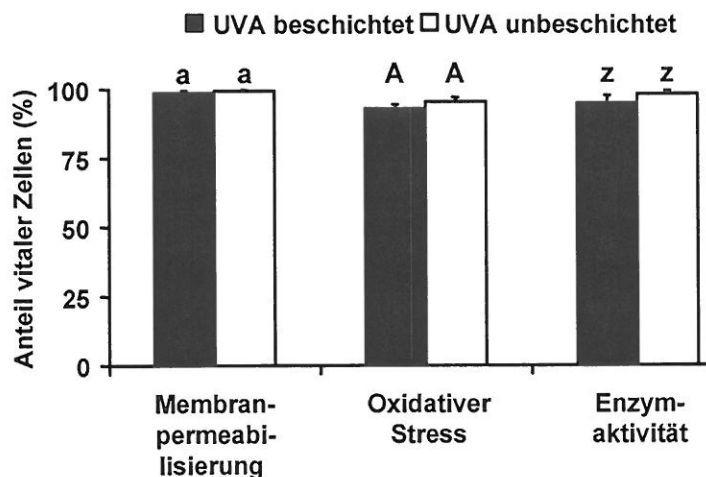


Abb. 4: Anteil vitaler Zellen (%) von *Stichococcus* sp. nach 48stündiger Inkubation der Algen auf photokatalytisch beschichtetem und unbeschichtetem Glas beim Test auf Membranpermeabilisierung (Fluoreszenzfarbstoff SYTOX® Green), oxidativem Stress (Fluoreszenzfarbstoff CM-H₂DCFDA) und Esteraseinhibition (Fluoreszenzfarbstoff CMFDA). Mittelwert +/- Standardabweichung, $n=3$. Buchstaben repräsentieren signifikante Unterschiede zwischen den Ansätzen ($p \leq 0,05$).

Diskussion

Während die chemische Wirksamkeit der Photokatalyse sehr einfach mit standardisierten Verfahren nachgewiesen werden kann, ist die biologische Wirksamkeit nur für wenige Organismen und sehr unterschiedlich überprüft worden. So wurde sehr häufig die Abnahme der koloniebildenden Einheiten (CFU) des Bakteriums *E. coli* gemessen und eine gute desinfizierende Wirkung der Photokatalyse nachgewiesen (z.B. Benabbou et al. 2007). Diese Ergebnisse sind aus mehreren Gründen nicht auf die Wirksamkeit gegen Algenbewuchs auf Fassaden übertragbar. (1) Die eingesetzte UV-Strahlung war oft um ein vielfaches höher als die Strahlung im Habitat der aeroterrestrischen Algen (z.B. 40 W m⁻² UVA bei Kiwi & Nadochenko 2005). (2) Photokatalyse schädigt Mikroorganismen durch die Oxidation von Zellwänden und Membranen (Kiwi & Nadochenko 2005). Die Widerstandsfähigkeit von Organismen stieg mit der Komplexität der Zellwände von Bakterien und Hefen (Kühn et al. 2003). Da Algenzellwände komplexer strukturiert sind als Bakterienzellwände, ist die geringere Effektivität der Photokatalyse nicht überraschend. (3) Zusätzlich verfügen aeroterrestrische Grünalgen über verschiedene Anpassungsstrategien an ihren extremen Lebensraum, die ihre Resistenz erhöhen können. So schützen sie sich durch die Bildung einer Schutzschicht aus extrapolymere Substanzen (EPS) vor Austrocknung (Karsten et al. 2007) und tolerieren oxidativen Stress (Mallick & Mohn 2000). Die widersprüchlichen Ergebnisse von Zinkoxid und photokatalytisch beschichteten Glasscherben weisen auf die schützende Wirkung von Biofilmen hin, sind zudem jedoch auch darin begründet, dass die photokatalytische Aktivität der verwendeten Zinkoxidkonzentrationen höher war als die der kommerziellen Produkte. Die Höhe der photokatalytischen Aktivität wurde als chemische Aktivität über den Abbau des Modellfarbstoffes Methylenblau nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Dennoch lässt sich aus der chemischen Aktivität nicht direkt auf die biologische Aktivität schließen. Während nur kleinste Modifikationen die Struktur des Methylenblaumoleküls verändern, ist die Inaktivierung von Mikroorganismen viel komplexer und erfordert eine Vielzahl von Radikalen (Marugan et al. 2010).

Da Modifikationen des Photokatalysators seine Aktivität erhöhen können (Hashimoto et al. 2005), ist eine mögliche bewuchshemmende Wirkung durch Photokatalyse nicht generell auszuschließen. Das entwickelte Verfahren, in welchem sowohl Wachstum als auch zellspezifische Vitalitätsparameter betrachtet werden, stellt nun eine gute Methode dar, um die photokatalytische Aktivität weiterer Materialien zu überprüfen.

Referenzen

- Benabbou AK, Derriche Z, Felix C, Lejeune P, Guillard C. 2007. Photocatalytic inactivation of *Escherichia coli* - Effect of concentration of TiO₂ and microorganism, nature, and intensity of UV irradiation. *Applied Catalysis B-Environmental* 76: 257-263.
- Eggert A, Häubner N, Klausch S, Karsten U, Schumann R. 2006. Quantification of algal biofilms colonising building materials: chlorophyll a measured by PAM-fluorometry as a biomass parameter. *Biofouling* 22: 79-90.
- Hashimoto K, Irie H, Fujishima A. 2005. TiO₂ photocatalysis: A historical overview and future prospects. *Japanese Journal of Applied Physics Part 1-Regular Papers Brief Communications & Review Papers* 44: 8269-8285.
- Karsten U, Schumann R, Mostaert A. 2007. Aeroterrestrial algae growing on man-made surfaces - what are the secrets of their ecological success? In: *Algae and cyanobacteria growing in extreme environments*. Seckbach J. (Ed.), Springer Berlin, pp. 585-597.
- Kiwi J, Nadochenko V. 2005. Evidence for the mechanism of photocatalytic degradation of the bacterial wall membrane at the TiO₂ interface by ATR-FTIR and laser kinetic spectroscopy. *Langmuir* 21: 4631-4641.
- Kühn KP, Chaberny IF, Massholder K, Stickler M, Benz VW, Sonntag HG, Erdinger L. 2003. Disinfection of surfaces by photocatalytic oxidation with titanium dioxide and UVA light. *Chemosphere* 53: 71-77.

Mallick N, Mohn FH. 2000. Reactive oxygen species: response of algal cells. *Journal of Plant Physiology* 157: 183-193.

Marugan J, van Grieken R, Pablos C, Sordo C. 2010. Analogies and differences between photocatalytic oxidation of chemicals and photocatalytic inactivation of microorganisms. *Water Research* 44: 789-796.

Scheerer S, Ortega-Morales O, Gaylarde C. 2009. Microbial Deterioration of Stone Monuments-An Updated Overview. *Advances in Applied Microbiology* 66: 97-139.

Veröffentlichungen

Gladis F., Eggert A., Karsten U., Schumann R. (2010) Prevention of biofilm growth on man-made surfaces: Evaluation of antialgal activity of two biocides and photocatalytic nanoparticles, *Biofouling* 26, 89-101

Gladis F., Schumann R. Effectivity of photocatalysis as algal growth preventing strategy for building materials, *in preparation*.